

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Proteasas de Streptomyces Fradiae : obtención por
fermentación y aplicaciones industriales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Francisco de Asís Maldonado Salvador

DIRECTOR:

Eliseo Gastón de Iriarte y Sanchiz

Madrid, 2015

Francisco de Asís Maldonado Salvador

TP
1984
174



x-53-224478-7

PROTEASAS DE STREPTOMYCES FRADIAE. OBTENCIÓN POR FERMENTACION
Y APLICACIONES INDUSTRIALES

Departamento de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 174/84

© Francisco de Asís Maldonado Salvador
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: H-20375-1984

- I -

AUTOR : FRANCISCO DE ASIS MALDONADO SALVADOR

TITULO DE LA TESIS DOCTORAL

" PROTEASAS DE STREPTOMYCES FRADIAE. OBTENCION
POR FERMENTACION Y APLICACIONES INDUSTRIALES" .

Departamento de Microbiología

Facultad de Farmacia

Universidad Complutense de Madrid

Año 1980

- II -

Deseamos expresar nuestro más profundo y sincero agradecimiento al Profesor Dr. D. Eliseo Gastón de Iriarte y Sanchíz, por su apreciable y valiosa ayuda y sus constantes consejos y orientaciones para realizar este trabajo.

A D^a Sagrario Mochales del Val; D^a M^a Dolores Trujillo - Mérida; D. Sebastián Hernández Fernández y D. Ricardo Segura Ferns, por su inestimable estímulo y colaboración en todo momento para el desarrollo de este trabajo.

A los Profesores del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, por su siempre desinteresado apoyo y enseñanzas.

A todas las personas que de una forma u otra han colaborado en la realización del trabajo.

En sincero recuerdo al Dr. D. Justo Martínez Mata, fallecido, que fue Director del Programa de Investigación de C.E.P.A., a quien debemos nuestra experiencia y de quien aprendimos como excepcional maestro, el buen hacer en Investigación.

Y Finalmente a la Compañía Española de la Penicilina y Antibióticos donde hemos podido realizar este trabajo.

A todos, muchas gracias.

INDICE

| | <u>Págs.</u> |
|--|--------------|
| 1. <u>INTRODUCCION</u> | 1 |
| 1.1. Enzimas proteolíticos y sus posibles utilizaciones. | 6 |
| 1.2. Utilización de los enzimas proteol- ticos en curtidos. | 7 |
| 1.3. Utilización en cosmética. | 8 |
| 1.4. Utilización en medicamentos. | 10 |
| 1.5. Utilización en la alimentación. | 11 |
| 1.6. Utilización en cervecería. | 19 |
| 1.7. Utilización en ganadería. | 24 |
| 2. <u>OBJETO DEL TRABAJO</u> | 29 |
| 3. <u>MATERIAL Y METODOS</u> | 31 |
| 3.1. <u>Laboratorio.</u> Selección del Microor- ganismo. | 31 |
| 3.1.1. Técnicas de adecuación y pre- paración del mismo. | 34 |

- IV -

| | |
|---|-----|
| 3.1.2. Preparación de inóculos. | 38 |
| 3.1.3. Fermentación en el Laboratorio | |
| Matraces de agitación. | 39 |
| 3.2. <u>Planta Semipiloto.</u> Fermentadores de | |
| 8 litros. | 44 |
| 3.2.1. Preparación de inóculos. | 44 |
| 3.2.2. Fermentadores de 8 litros. | 51 |
| 3.2.3. Fermentación. | 67 |
| 3.3. <u>Planta Piloto</u> | |
| 3.3.1. Fermentadores. | 75 |
| 3.3.2. Fermentación. | 82 |
| 3.4. <u>Extracción</u> | 87 |
| 3.4.1. Equipo | 87 |
| 3.4.2. Métodos de Extracción. | 91 |
| 3.5. <u>Medios de cultivo</u> | 95 |
| 3.5.1. Laboratorio. | 95 |
| 3.5.2. Planta Semipiloto y Planta Piloto. | 98 |
| 3.6. <u>Métodos de valoración</u> | 109 |
| 3.6.1. Patrones y sustancias de referencia. | 110 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 3.6.2. | Determinación de la actividad Queratinolítica. (Método de "pezuña"). | 112 |
| 3.6.3. | Determinación de la actividad Hemoglobinolítica. (Método de Anson). | 122 |
| 3.6.4. | Comparación entre los dos métodos. | 130 |
| 3.6.5. | Método de determinación de azúcar. | 132 |
| 3.6.6. | Método de determinación del pH. | 137 |
| 3.6.7. | Método de determinación del micelio. | 138 |
| 3.6.8. | Método estadístico. | 139 |
| 4. | <u>RESULTADOS</u> | 141 |
| 5. | <u>PRODUCTOS OBTENIDOS</u> | 265 |
| 5.1. | <u>Características generales</u> | 267 |
| 5.2. | <u>Tablas analíticas</u> | 283 |
| 6. | <u>EMPLEO DE LOS ENZIMAS PROTEOLITICOS</u> | 287 |
| 6.1. | <u>Como depilantes</u> | 287 |
| 6.2. | <u>En productos farmacéuticos</u> | 291 |

- VI -

| | | |
|------|----------------------|-----|
| 6.3. | <u>En ganadería</u> | 296 |
| 6.4. | <u>En cervecería</u> | 309 |
| 7. | <u>CONCLUSIONES</u> | 317 |
| 8. | <u>BIBLIOGRAFIA</u> | 321 |

1. INTRODUCCION

Todas las proteasas, ya sean de plantas, animales o de origen microbiano, se caracterizan por su facilidad para catalizar la ruptura hidrolítica de las uniones peptídicas entre los aminoácidos.

La mayor parte de las proteasas aisladas y purificadas son específicas con relación a los enlaces peptídicos que pueden romper; así por ejemplo, la tripsina cristalizada hidroliza las cadenas de los grupos carboxílicos de los aminoácidos básicos, lisina y arginina. Sin embargo, en otras proteasas cristalinas, tales como pepsina, quimotripsina, papaina, carboxipeptidasa y aminopeptidasa esta especificidad no se ha aclarado aún completamente.

Los microorganismos que utilizan las proteínas como material nutriente, tienen que producir los enzimas necesarios para la hidrólisis de estas proteínas. De esto se deduce, que debe haber un gran número de proteasas microbianas producidas por numerosas especies de microorganismos, incluyendo muchas bacterias, hongos y levaduras.

Las proteasas microbianas, útiles en el campo comercial, se obtienen de fuentes bacterianas o fúngicas y difieren según su procedencia, en su especificidad y modo de actuación.

Se han purificado o cristalizado muy pocas proteasas microbianas, como asimismo apenas se conoce la especificidad de estos enzimas. Tal vez los trabajos más interesantes sean los de algunos investigadores japoneses al cristalizar una proteasa del Aspergillus orizae y una proteasa del género Bacillus subtilis.

Los enzimas proteolíticos que se encuentran en el comercio son mezclas de proteasas: endopeptidasas y exopeptidasas. Su acción proteolítica por tanto es extremadamente complicada al tener estructuras proteínicas complejas de alto peso molecular, que pueden contener hasta veinte aminoácidos diferentes en varias series.

El descubrimiento de que muchos de los cambios químicos industriales que se presentan en los procesos microbianos son enteramente enzimáticos, condujo a diversos intentos para preparar enzimas purificados a escala comercial. Esta fue una de las causas por lo que se inició el estudio de este campo.

La primera aplicación práctica conocida de las proteasas microbianas fué el "Koji" de los japoneses, introducido en Japón -

hace unos 1.700 años, procedente de China.

Este término se refería específicamente al producto obtenido del crecimiento del hongo Aspergillus orizae sobre los granos de cereales.

La actividad proteolítica del "Koji" se ha utilizado durante siglos y todavía hoy se sigue usando en las fabricaciones de sake, soja sazónada y otros productos alimenticios y bebidas japonesas, (1), si bien la naturaleza enzimática y su modo de acción no se conoció hasta la última mitad del siglo XIX, después que Japón abriera sus puertas a la civilización occidental. Fué el Dr. Jokichi Takamino quien, al introducir el uso del "Koji" en los Estados Unidos hacia 1.890, dió el primer paso para la aplicación comercial de los enzimas fúngicos concentrados. El mismo desarrolló el procedimiento de cultivo del hongo sobre crema de salvado, la extracción con agua de los enzimas "Koji" y su posterior precipitación con alcohol.

Veinte años más tarde en Francia, Boidin y Effront, fueron los pioneros en la producción de enzimas bacterianos.

Yoshida, F. en 1.962, (2), obtuvo una proteasa cristalina interesante a partir de un moho negro designado como Aspergillus saitoi y que se llamó aspergillo-peptidasa-A. Este enzima es muy

diferente a las proteasas microbianas conocidas anteriormente, es una proteasa ácida, y con unas propiedades muy similares a los enzimas - animales, pepsina y renina. La actividad óptima está a un pH de 2,5 á 3,5 y la máxima estabilidad a pH 4,0. Se inactiva rápidamente a temperatura ambiente y a niveles de pH por encima de 4,0 pero la presencia de caseína estabiliza el enzima a pH 6,0.

Cinco años después, Morihara, K. en 1.967, (3), estudió la proteasa alcalina producida por el Streptomyces fradiae observando que, en contraposición a la aspergillo-peptidasa-A, era estable a un rango de pH de 5,0 á 10,0 y baja temperatura.

Basándose en el éxito del método de los cultivos sumergidos para la producción de antibióticos, se empezaron a utilizar hace poco tiempo estos mismos métodos para la producción de enzimas microbianos y en la actualidad se emplean en gran escala.

Hasta la fecha se ha desarrollado un número relativamente pequeño de aplicaciones industriales con las proteasas microbianas, pero todas ellas importantes. Este número se está aumentando gracias a la investigación realizada y se ampliará más sin duda, en el futuro, tal como nos indican las comunicaciones de Tsyperovich, A.S. (4), Sherwood, M. (5), y Okazaki, H. (6).

Hay numerosos microorganismos que han demostrado su capacidad de producir proteasas, sin embargo su comercialización está restringida por consideraciones legales no actualizadas.

Se deben considerar los siguientes factores, si se quiere conseguir una comercialización provechosa :

- El organismo debe crecer y producir enzimas sobre materia prima barata y fácil de obtener.
- Debe producir proteasas extracelulares de alto rendimiento y en corto tiempo de fermentación, preferiblemente en cultivos sumergidos.
- El enzima crudo se debe aislar facilmente y con una buena recuperación de los caldos de fermentación.
- El organismo no debe ser patógeno, ni estar relacionado filogenéticamente a un patógeno.
- No debe producir cualquier otro material activo biológicamente.
- El organismo debe ser fácilmente eliminado o inactivado por calor.

- Los enzimas producidos deben tener las características precisas para ser empleados en su aplicación final.

1.1. Enzimas proteolíticos y sus posibles utilizaciones

Los usos industriales más frecuentes hoy en día según diferentes autores (7), (8), se exponen en la siguiente tabla :

| USOS DE LOS ENZIMAS PROTEOLITICOS EN INDUSTRIAS | | |
|---|-------------|---------|
| Industria y uso | Procedencia | |
| | Bacteriana | Fúngica |
| Cocimiento de galletas, pan | - | + |
| Alimentos de cereales del desayuno | + | + |
| Ablandamiento de carnes. | + | + |
| Aumento de la transparencia de la cerveza a prueba de frío. | + | + |
| Ingredientes de alimentos para animales | + | + |
| Hidrolizados de proteínas. | + | + |
| Rendido de pieles. | + | + |
| Depilado de pieles. | + | + |
| Limpieza en seco de tejidos. | + | - |
| Mordientes textiles. | + | + |
| Recuperación de películas. | + | + |
| Desbridamiento de heridas. | + | - |
| Disminución de inflamaciones, hematomas, coágulos sanguíneos. | + | + |

1.2. Utilización de los enzimas proteolíticos en curtidos

La industria del cuero utiliza las proteasas microbianas en el rendido de la piel, habiendo sido sustituidos la mayoría de los métodos clásicos empleados de empajar las pieles en fosos, con barro o papilla de sulfuros.

Las investigaciones hechas, cada vez en mayor escala por laboratorios de diferentes países, han demostrado que los enzimas bacterianos son muy eficaces en la depilación de pieles de bóvidos. Puede esperarse por tanto que algunas de estas proteasas reemplacen el método más lento y menos eficaz que se emplea corrientemente.

Las diferentes fases de tramiento de la piel son :

1º.- Premojado

2º.- Pelado

3º.- Sacudido para eliminar todo el material interfibrilar.

Los enzimas pueden usarse en cualquiera de estas tres fases, pero tienen una mayor y particular aplicación en las dos últimas. Los más utilizados han sido las proteasas del Bacillus subtilis, Keay, L. (9).

Nickerson, W.J., en 1957 (10) investigó el proceso del tratamiento de materias queratinosas, en particular la degradación de la queratina por los enzimas producidos por el Streptomyces fradiae y en el año 1962 (11), estudió las propiedades conjugadas del enzima elaborado por el Streptomyces fradiae, así como las propiedades del enzima cristalizado (12). Años más tarde, Morihara, K. y col. en 1966, (13), investiga con diferentes cepas de Streptomyces y observa que la máxima cantidad de enzimas proteolíticos se obtenía con cepas del Streptomyces fradiae.

1.3. Utilización en Cosmética

Gavern, T.W. 1963, (14) dice que los depilatorios modernos tienen por objeto eliminar el pelo no deseado en brazos, piernas y axilas y está basado en agentes reductores y álcalis.

El agente reducto ataca a los ligamentos de bisulfuro de cisteína en la queratina y el álcali incita a la hinchazón y dispersión del reducido tejido proteico.

Los depilatorios de esta clase, llamados depilatorios químicos, actúan, únicamente a pH. elevado, por lo que el efecto de dichas composiciones sobre una piel normal no resulta nunca beneficioso.

Desde hace algún tiempo se sabe que algunos enzimas proteolíticos producidos por Streptomyces, son capaces de digerir queratina nativa e inalterada, y que cepas de Streptomyces fradiae, son extraordinariamente activas en la descomposición de la queratina.

Una patente de la Mearl Corporation en EE.UU. (1), ha descrito el empleo de Streptomyces fradiae, para convertir estas sustancias queratinosas en componentes solubles de interés comercial, de empleo como agente depilatorio.

El enzima queratinolítico es estable a un pH de 7,0 a 8,0; por encima de un pH 8,0 la estabilidad comienza a disminuir. El enzima queratinolítico contiene algunos grupos sulhídricos y por lo tanto, es diferente a otros enzimas de tipo semejante. Así, es posible incorporarlo a un envase standard de aerosol, ajustando el pH. a aproximadamente 7,5 antes de aplicar la sobrepresión.

Por esta razón, la patente recomienda el almacenaje de la mezcla acuosa en sitio fresco y en un medio amortiguador dentro de los valores de pH 7,0 - 8,0. Por lo demás, el enzima seco puede guardarse durante mucho tiempo sin pérdida de actividad.

En términos generales, ha de subrayarse que la eficacia del depilatorio depende de la pureza del enzima utilizado, del

pH del preparado terminado, de la presencia de materiales que pueden comprometer la fórmula, y de otros factores. Además esta clase de depilatorios no tiene una acción tan rápida como los depilatorios químicos, aunque es importante señalar que la depilación enzimática es mucho menos irritante para la piel que la depilación química.

Cualquier químico cosmético que ha de enfrentarse con el problema de perfumar un depilatorio químico basado en tioglicolatos o sulfitos y a valores de pH. 12,0 o más, estará seguramente de acuerdo que en este medio, un perfume se estropea fácilmente y frecuentemente. Para perfumar depilatorios enzimáticos no existe esta dificultad, ya que ni hay que quitar un olor ofensivo, ni se ha de considerar un pH. elevado.

El futuro podrá ver un desarrollo ulterior de esta forma interesante de depilatorio, ya que el empleo de los depilatorios químicos, basados, como lo son los actuales, en agentes reductores y álcalis fuertes, dejan mucho que desear desde el punto de vista dermatológico.

1.4. Utilización en medicamentos

Stouldt, T. (15) y Wagues, H. y Horth, H. (16), hi -

cieron un estudio sobre los enzimas proteolíticos en la higiene oral. -
El diente tiene normalmente una cubierta de un material fijador llamado
do "placa", que es una combinación de microorganismos varios sobre
una matriz orgánica constituida por dextranos y proteínas.

Fitzgerald, R.J. (17), ha comprobado en hamsters, -
que la administración de la dextranasa del Penicillun funiculosum re-
duce las "placas" dentales.

Más recientemente, Shaver, K.J. y col. (18), ha de-
mostrado que la mezcla de proteasa-amilasa de Bacillus subtilis, en -
forma de solución acuosa, reduce el 50% de las "placas" en humanos.

Estudios, "in vitro", con una "placa" sintética sobre
cristal o platino, han puesto en evidencia que esta proteasa neutra es
el agente más activo en la mezcla de enzimas, lo cual se ha demos--
trado también "in vivo".

1.5. Utilización en la alimentación.

Cárnes

Según Dumont, B.L. (19), las cualidades organolép--
ticas de las carnes que tienen en cuenta los profesionales que viven de
su comercio, son : color, textura de las fibras musculares y tejido -

conjuntivo, adiposidad (grasas de recubrimiento e intramuscular), -
cualidades físicas de las grasas, grado de firmeza y humedad aparen-
te. Los consumidores dan importancia sobre todo a la blandura junto -
a la succulencia y el gusto.

Los laboratorios de investigación en este campo, se -
esfuerzan en evaluar objetivamente la blandura de la carne consideran-
do que los consumidores aprecian estas características según la ma -
yor o menor facilidad con que la carne se puede cortar, desgarrar y
triturar con el aparato dental y que las carnes de bóvidos, ovejas, -
cerdos, etc., poseen diversos grados de dureza.

Para Craplet, C. 1966 (20), todos los problemas or -
ganolépticos que afectan a la conservación de la carne o su transfor-
mación industrial, se deben a reacciones enzimáticas, originadas por
enzimas propios del animal o por enzimas de microorganismos.

Los enzimas proteolíticos influyen esencialmente so -
bre la blandura de la carne. Por un lado los enzimas de origen vege-
tal (papaína, ficina, bromelína) por otro, los enzimas de origen fún-
gico. El grado de ternura de la carne depende, en gran medida, de la
concentración en proteasas que se le incorpora. Prácticamente 0,0015%
de papaína es suficiente para el ablandamiento enzimático artificial -

de la carne y a esta concentración, el enzima no modifica el aroma y no dá mal sabor.

Todas las proteasas de las que estamos hablando son activas a las temperaturas de refrigeración de la carne (0°C. a 4°C), e incluso a temperatura ambiente. De forma general, las proteasas de las plantas presentan una buena actividad a los pH. normales de las carnes; por el contrario, las proteasas pancreáticas tienen una actividad óptima en medios ligeramente alcalinos.

Las proteasas fúngicas están generalmente bien adaptadas a los pH. medios de las carnes y en cuanto al pH. óptimo de las proteasas bacterianas, varía mucho según el género de bacteria considerada.

Son muy complejos de definir el aspecto higiénico y legislativo de la utilización de los enzimas en las industrias alimenticias y es muy difícil el conseguir una impregnación homogénea de la carne por las proteasas cuando el animal está muerto, por lo que se pensó, que se podrían inyectar estas proteasas en el animal antes de su muerte, consiguiendo así un reparto más homogéneo por todos los tejidos del animal.

En 1959, se empezó a inyectar por vía intravenosa la

papaína a los bóvidos antes de matarlos. La inyección ante-mortem de enzimas proteolíticos, también llamada procedimiento SWIFT, se debe a la idea del americano Beuk, J.F., (1959) (21), y consiste prácticamente en inyectar en la zona yugular de los bóvidos 30 minutos antes de su muerte, una solución al 5% de papaína en suero fisiológico. La cantidad de papaína inyectada puede variar de 1,0 mg. a 30 mg. por kg. de peso vivo, en función con el grado de pureza del enzima. Las concentraciones demasiado elevadas dan mal sabor a la carne.

Los efectos de la inyección de papaína han sido estudiados sobre la musculatura esquelética de la vaca, Mc. Intosh, E.N. - (1963), (22), sobre los músculos de pollo, Huffman, D.L. 1967, (23), la sangre y la orina de conejo jóvenes, Cambier, D. (1969), (24), el hígado de ratas, Nestorov, N. 1970, (25), los músculos de ratón, Nestorov, N. 1971, (26).

En la actualidad hay un gran número de proteasas en experimentación, Los enzimas más utilizados, Papaína Bromelina y Ficína provienen de plantas tropicales; de hongos como Aspergillus oryzae, Aspergillus terricola; de origen animal, principalmente tripsina pancreática y de origen bacteriano como las de los Bacillus mesophilus y Bacillus Thermophilus.

Las proteasas del Aspergillus , son activas a un rango grande de pH, lo que las hace ventajosas para el ablandamiento de carne. Han sido comercializadas en los Estados Unidos bajo el nombre "Rhozyme P. II".

Los diferentes procedimientos tecnológicos puestos en marcha después de la adición de la solución enzimática, no han modificado de forma notable la capacidad de hidratación enzimática, el grado de proteolisis y la microestructura de la carne.

Los enzimas se utilizan también como sales ablandadoras y se presentan generalmente bajo la forma de polvos o disueltas en agua, pero también se encuentran en el comercio como soluciones enzimáticas. En los Estados Unidos, estas sales se usan en la cocina familiar y restaurantes, y también en los centros de distribución de carne refrigerada preembalada, o carne congelada.

Las sales ablandadoras suelen tener generalmente enzimas y diversos ingredientes en dosis variables: glutamato monosódico, orto y polifosfatos, diversos ácidos orgánicos, o sus sales alcalinas, sustancias amiláceas, hidrolizados de proteínas vegetales o concentrados de jugos de carne y también algunos agentes hidratantes tales como el propilenglicol.

Se debe hacer notar que las soluciones de sales ablandadoras pueden igualmente servir para la rehidratación de las carnes congeladas o para la inducción de hojas intercaladas entre la carne y su envoltura exterior.

Como se ve, la utilización de los enzimas proteolíticos tiene una gran importancia para ablandar las carnes y tripas de animales, y para las conservas de carne. Los productos comerciales contienen papaína o bromelína como agentes activos pero, puesto que diferentes enzimas proteolíticos atacan preferentemente tejidos diferentes de carne, se pueden combinar proteasas de plantas, bacterias y hongos, que tienen ventajas sobre un único enzima para ablandar la carne.

Galletas y fabricación del pan

Las proteasas microbianas se emplean en la fabricación de galletas añadiéndolas a la pasta preparada, (1), porque con este tratamiento se obtienen las ventajas siguientes:

- Reducción del tiempo de mezcla.
- Estirado uniforme de la pasta sin endurecimiento o levantamiento de los bordes.
- Aumento del estirado.

- Reducción en la cantidad de manteca necesaria para dar la delicadeza deseada.
- Obtención de un cocido excepcionalmente uniforme y un mejor y más uniforme tostado.
- Grano más abierto.
- Mejoría del gusto y del aroma.

La mayoría de los panaderos emplean ahora proteasas de hongos, con lo que se disminuye notoriamente el tiempo de mezcla de las pastas, al producirse una ligera degradación del gluten de la harina de trigo. Además, la proteasa de hongos aumenta la extensibilidad de las pastas, facilitando el manejo más adecuado.

Otros beneficios adicionales son : mejoramiento del grano, textura y comprensibilidad del pan.

Los alimentos cereales también se tratan con enzimas proteolíticos para modificar las proteínas, obtener mejores procedimientos de fabricación incluyendo una mejora en la manipulación, aumento de la capacidad de desecación y un menor esfuerzo en su elaboración.

Harinas de pescado.

Existen concentrados proteicos de pescado destinados a la alimentación humana, preparados a partir de pescados frescos no comercializados o en conserva, y numerosos países como por ejemplo: los Estados Unidos, Suecia, Chile, Canadá, etc., los producen industrialmente.

Estas proteínas se pueden utilizar en países en vías de desarrollo o en países más industrializados, para el enriquecimiento de harinas, para la fabricación del pan, de bizcochos, de pastas alimenticias e igualmente para la preparación de productos a base de carne. Hay que señalar que son muy insolubles y difíciles de dispersar en medio acuoso, puesto que solamente un 20% de la parte nitrogenada es soluble en agua.

Cheftel, C. en 1.972, (27), hizo un estudio sobre la solubilización enzimática para diversas proteasas, solas o combinadas, de origen animal, vegetal o microbiano.

La pepsina, la pancreatina y la "Pronasa" fueron las más eficaces, en lo que se refiere a la prontitud de solubilización de la parte nitrogenada, y el porcentaje final de solubilización obtenido. El porcentaje final no depende de la preparación enzimática, pues se

determina con un exceso de enzima. La "Pronasa" proviene del Streptomyces griseus y contiene una decena de enzimas proteolíticos de diferentes especificidades, con una zona de pH óptima de 7,0 á 9,0.

Otro ejemplo del uso de las proteasas bacterianas en la industria del pescado es la utilización de pescados no comestibles y restos de pescados para obtener aceites y harinas. El procedimiento general es cocer el pescado, prensar y extraer el aceite. Se extraen los resíduos sólidos para obtener harina de pescado y la fase acuosa se evapora hasta alrededor del 50% de sólidos, para obtener solubles de pescado. Tanto la harina de pescado como los solubles, se emplean como piensos de animales. La adición de enzimas proteolíticos a la fase acuosa previa a la evaporación, hace que ésta aumente eficazmente al disminuir la viscosidad, Cheftel, C. y col. 1.971 (28).

1.6. Utilización en cervecería.

La industria cervecera depende en exclusiva de los cambios enzimáticos que realizan en primer lugar los enzimas que se encuentran en la cebada, y posteriormente los que se forman después de la transformación de la cebada en malta. El único enzima importante en la cebada es la Beta-amilasa.

Los enzimas más importantes en la malta son las car-

bohidrasas: Alfa-amilasa y Beta-amilasa y los enzimas proteolíticos: proteasas y peptidasas, así como la Beta-gluconasa que descompone el beta-glucano. Soerensen, S.A. 1.972, (29).

Desde hace mucho tiempo se tenía la idea de reemplazar o sustituir los enzimas de la malta por enzimas exteriores. Boidin y Effront, en 1.932, (30), patentaron un método para la licuefacción de granos crudos por la amilasa bacteriana, y Bertel, R. en 1.939, (31), patentó el empleo de enzimas pancreáticos en la obtención de la cerveza, con grandes cantidades de grano crudos.

A finales de siglo, Takamine, J. (32), describe el empleo de enzimas, pero hasta finales del año 1.960, no se pueden producir en cantidades comerciales los enzimas microbianos necesarios para sustituir la malta.

Los enzimas utilizados en la industria cervecera se producen a partir de cultivos de Bacillus subtilis, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae o Aspergillus rhizopus. Los microorganismos se cultivan sobre sustratos de almidón, de proteínas y de algunas sales minerales, indispensables para su crecimiento.

Los primeros cultivos se hicieron primero en cuevas de fermentación cerradas, en condiciones higiénicas altamente contro-

ladas, y posteriormente por fermentación sumergida.

El líquido que contiene los enzimas se aísla y purifica de forma que los enzimas finales se encuentren en forma sólida o líquida con una actividad enzimática muy elevada y con un grado de pureza que cumpla las exigencias de las autoridades sanitarias.

Las proteasas bacterianas descomponen las proteínas de la cebada en los mismos aminoácidos y péptidos que los enzimas existentes en la malta. Una parte de estas proteasas puede a veces activar la Beta-amilasa latente en la cebada y activar indirectamente la fermentabilidad del mosto. Las proteasas comerciales se pueden dividir en dos grupos:

- Proteasas alcalinas que son parcialmente inhibidas por la cebada y la malta.
- Proteasas neutras que no son inhibidas.

Uno de los problemas actuales, es la relación existente entre las propiedades de la malta y la calidad de la cerveza. Entre los aspectos que se tienen en cuenta muy especialmente citamos:

Para la fabricación:

- El rendimiento en la fabricación de la cerveza.
- La velocidad de filtración del mosto.
- La atenuación límite.

y para el producto final:

- La estabilidad no biológica.
- La sutilidad de la espuma.
- Las propiedades organolépticas.

La calidad de la malta tiene repercusiones sobre el conjunto de la fabricación. Algunos aspectos referentes a la estabilidad no biológica, se han manifestado a la luz de los trabajos originales proseguidos después de diez años en Nancy, muchas veces en colaboración con algunos laboratorios extranjeros y especialmente con la Maaka Beck Braveray (Brême).

La estabilidad no biológica de la cerveza está esencialmente condicionada por dos clases de sustancias: una, formada por un grupo de proteínas solubles provenientes de la malta, y otra por los taninos producidos por la condensación irreversible de polifenoles, relativamente simples, cedidos al mosto por la malta y el lúpulo. La malta, el sistema de la fabricación de la cerveza, el tipo de fermentación y los tratamientos de estabilización a los que se la somete, producen trans

formaciones que, durante el curso de la conservación, serán más o menos rápidas y que inevitablemente tienden hacia la formación de turbideces o sedimentos. Sin embargo, el problema no es suprimir radicalmente la formación de turbidez, que de momento parece inseparable de la cerveza, sino más bien retardar la aparición de la misma, en una medida apropiada y sin pérdida de las propiedades organolépticas tradicionales, Perez, J. y Segura, R. 1.978, (33).

Estas medidas, técnicas y tecnológicas, se llevan sobre las materias primas, sobre el diagrama de fabricación de la cerveza, la capa de la levadura, la vigilancia, y la cantidad de oxígeno. Todas ellas son medidas naturales. Entre las artificiales se usan las que la técnica moderna pone a disposición de la fabricación de la cerveza como son los absorbentes, enzimas y antioxidantes.

Numerosos investigadores como DeClerek, J. (34), Macey, A. (35), Schaft, H. (36), Van Drohme, M. (37) y Raible, K. (38), estudian que el tratamiento de la cerveza final con los enzimas proteolíticos, constituye una medida eficaz para aumentar la estabilidad.

Las modificaciones en la estructura coloidal, provocan los enturbiamientos de la cerveza (debido al frío o al reposo prolongado). Por la coagulación de las partículas más finas se forman películas

y sedimentos causados por polipéptidos y polifenoles, así como hidratos de carbono y productos minerales. Este fenómeno indeseable (reversible en el caso del enturbiamiento provocado por el frío), no está solamente influenciado por las materias primas sino, sobre todo, por la tecnología de la preparación de la cerveza, Segura, R. (39).

A pesar de los numerosos conocimientos crecientes sobre las causas del enturbiamiento, numerosas empresas se han limitado para obtener la estabilidad físico química deseada, al empleo de sustancias que eliminen o transformen, al menos parcialmente, los principales constituyentes de los enturbiamientos, Chapon, L. (40).

Con este fin, se encuentran hoy día en el comercio numerosas sustancias de origen diverso que poseen un mecanismo de acción diferente.

1.7. Utilización en ganadería.

Recientemente se ha concedido un gran interés a la adición de enzimas en los alimentos de animales, tales como aves de corral, cerdos, ganado vacuno y ovejas, Rust, J.W. (41).

La adición de enzimas adecuados, generalmente de origen bacteriano, ha dado lugar a un aumento del porcentaje de peso y una

disminución de la cantidad de alimento necesario por unidad de incremento de peso para animales jóvenes. Sin embargo, queda por hacer un gran trabajo experimental para averiguar con certeza qué enzima y qué ración producen la mayor respuesta de crecimiento, o más simple aún, si el suplemento de enzimas puede aumentar la producción de huevos o leche en animales adultos y de qué forma.

Los hidrolizados de proteínas para la preparación de condimentos y dietas especiales y para alimentos de animales, se obtienen por la hidrólisis enzimática de proteínas de plantas, carnes, pescados y leche. El proceso enzimático tiene ventajas sobre la hidrólisis ácida o alcalina de las proteínas, como son la simplicidad del equipo empleado y la falta de destrucción de los aminoácidos.

| PRINCIPALES ENZIMAS PROTEOLITICOS DE ORIGEN VEGETAL (57) | | | | |
|--|--|---|----------------|--------|
| ENZIMA | REACCION | ORIGEN | p.H. óptimo | P.M. |
| Papaina | Hidroliza péptidos, - amidas y ésteres. | Látex de la fruta de la <u>Cárica pa- paya.</u> | 6,0-6,8 | 23.350 |
| Quimopa- paina. | Hidroliza péptidos, - amidas y ésteres. | Látex de la fruta de la <u>Cárica pa- paya.</u> | 7,2 | 27.000 |
| Ficina | Hidroliza péptidos, - amidas y ésteres. | Látex de hi- guera. | 6,7 | 26.000 |
| Bromelina | Hidroliza péptidos, - amidas y ésteres. | Tronco de - piña. | 6,0 | 20.000 |

| PRINCIPALES ENZIMAS PROTEOLITICOS DE ORIGEN ANIMAL (57) | | | | |
|---|--|-----------------------------|----------------|--------|
| ENZIMA | REACCION | ORIGEN | p.H. óptimo | P.M. |
| Pepsina | Hidroliza los péptidos. | Jugo gástrico (cerdo) | 1,8-2,0 | 36.000 |
| Tripsina | Hidroliza péptidos, amidas, ésteres, etc. y los enlaces de los grupos L-carboxílicos de la Arginina o L-Lisina. | páncreas (bóvidos) (cerdos) | 7,8-8,5 | 23.350 |
| Quimotripsina A. | Hidroliza péptidos, amidas, ésteres, etc. y grupos carboxílicos de ácidos aminados aromáticos | páncreas (bóvidos) (pollos) | 7,8-8,0 | 24.000 |
| Quimotripsina B. | Hidroliza péptidos, amidas, ésteres, etc. y grupos carboxílicos de ácidos aminados aromáticos | páncreas (bóvidos) | 7,8 | 24.850 |
| Quimotripsina C. | Hidroliza, péptidos, amidas, ésteres, etc. y los grupos carboxílicos de la L-Leucina y ácidos aminados aromáticos. | páncreas (cerdos) | 7,8 | 23.800 |
| Catepsina C | Hidroliza los péptidos, - en particular enlaces de ácidos aminados aromáticos con un grupo amino libre. | bazo (bóvidos) | 5,0 | 21.000 |
| Catepsina D | Hidroliza los péptidos. | bazo (bóvidos) | - | 58.000 |

| PRINCIPALES ENZIMAS PROTEOLITICOS DE ORIGEN MICROBIANO (9) | | | |
|--|-------------------|------------|-----------------------|
| MICROORGANISMO | ENZIMA | pH óptimo | P.M. |
| <u>Aspergillus niger</u> | Proteasa ácida | 2,0 - 5,0 | 35.000 |
| <u>Aspergillus orizae</u> | " " | " | |
| <u>Rhizopus chinensis</u> | " " | " | |
| <u>Endothia parasítica</u> | " " | " | |
| <u>Bacillus cereus</u> | Proteasa neutra | 7,0 - 8,0 | 35.000 a 40.000 |
| <u>Bacillus megatherium</u> | " " | " | |
| <u>Streptomyces griseus</u> | " " | " | |
| <u>Pseudomonas aeruginosa</u> | " " | " | |
| <u>Penicillium funiculosum</u> | Dextranasa | Neutro | |
| <u>Bacillus subtilis</u> | Proteasa alcalina | 9,5 - 10,5 | 26.000 a 34.000 |
| <u>Streptomyces fradiae</u> | " " | " | |
| <u>Streptomyces griseus</u> | " " | " | |
| <u>Streptococcus faecalis</u> | Proteasa | Variable | |

2. OBJETO DEL TRABAJO

Analizados los antecedentes ya expuestos en la parte correspondiente que demuestran la utilización y empleo en diferentes aplicaciones industriales de productos obtenidos a partir de diferentes Actinomicetos y más concretamente del Streptomyces fradiae, consideramos que, podríamos realizar fermentaciones con las cepas de Streptomyces fradiae existentes en nuestra Empresa, y procedentes del programa de selección de antibióticos que se llevaba a cabo, encaminadas a producir enzimas proteolíticas susceptibles de empleo en alguna o varias de las aplicaciones descritas.

Con esta idea, planificamos el trabajo experimental teniendo como objetivo el llegar a la obtención de enzimas proteolíticas en las mejores condiciones de actividad, pureza y rendimiento, para lo cual se fueron ensayando y seleccionando las colonias más productoras, los mejores medios de cultivo y las condiciones de fermentación más adecuadas.

Todas estas fases del trabajo, culminaron en la obten-

ción de productos activos, con los que se realizaron las determinaciones analíticas necesarias para comprobar las características y actividad proteolítica de los productos que se iban obteniendo.

Una vez establecidas por nosotros las condiciones de obtención de estas enzimas proteolíticas, se pasó el proceso a la fábrica para su obtención industrial. Posteriormente se recibió la información pertinente en cuanto a su desarrollo y ensayos de aplicaciones de los productos obtenidos.

Esta parte se comenta en cuanto que en ella se han confirmado los resultados obtenidos y las aplicaciones de estas enzimas proteolíticas que fueron fabricados conforme a la experimentación desarrollada por nosotros.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Laboratorio.- Selección del microorganismo

El trabajo sobre enzimas proteolíticos se inició con una cepa de Streptomyces fradiae aislada de una muestra de tierra y clasificada en el laboratorio de investigación de la Compañía.

Las características y propiedades de la cepa aislada, están de acuerdo con las descritas en el Bergey's (42), y Waksman, S .A. y col. (43), para el Streptomyces fradiae.

Son las siguientes:

Microscópicamente las muestras tomadas de los tubos de agar inclinados presentaban filamentos e hifas rectas y ramificadas, no espirales. Los conidios son en forma de vara, u ovalados y de un tamaño entre 0,5 a 1,25 micras.

En las pruebas que realizamos con diferentes medios de cultivo se observó:

Siembra en picadura en gelatina: la colonia presenta un color crema y un crecimiento denso.

Crecimiento sobre agar sintético: extendido y de colores oscuros. El micelio aéreo es grueso, algodonoso, rosa-nacarado y cubre toda la superficie.

Crecimiento en almidón agar: extendido y de color oscuro.

Sobre glucosa agar: el crecimiento es poco abundante y con brillo.

Sobre agar superficie: se presentan colonias amarillentas, con bordes rugosos.

En caldo glucosado: el crecimiento es denso y abundante y forma un anillo amarillo-anaranjado, y el sedimento pierde color.

En leche tornasolada: se produce un crecimiento en halo ténue de color cremoso. Coagula, peptoniza y alcaliniza la leche tornasolada.

Sobre patata: el crecimiento es poco abundante y de color anaranjado.

No reduce los nitritos a nitratos.

Forma pigmentos no solubles.

Hidroliza el almidón.

Es aerobio y su temperatura óptima de crecimiento es de 25º C.

3.1.1. Técnicas de adecuación y preparación del mismo.

Aislamiento de colonias de Streptomyces Fradiae.

Primera siembra. Se siembran placas (con medio A. y QP.), con la colonia elegida de Streptomyces fradiae y después de incubadas, se seleccionan por su aspecto macroscópico, las colonias - que se vayan a aislar.

Inspección y selección de las placas. Se inspeccionan las placas sembradas e incubadas durante 5-7 días a 28º C., para seleccionar aquellas en las que hayan crecido colonias aisladas.

Preparación de cultivos primarios.

De las placas seleccionadas, se eligen las colonias y con estas colonias de Streptomyces fradiae, se preparan cultivos esporulados en medio sólido (Q.P.) que, a la vez que sirven como ma-

terial para posteriores siembras en otros medios, garantizan su conservación indefinida. Los cultivos así obtenidos, se denominan cultivos primarios.

Cultivos primarios en tubos de agar inclinados.

Se emplean tubos de ensayo de vidrio Pyrex de 15 x 160, preparados con agar inclinado, (medio QP.), a los que se inoculan las colonias seleccionadas por triplicado, (tres tubos por colonia).

Estos cultivos primarios se incuban a 28°C, durante 5-7 días, inspeccionándolos a las 24 y 48 horas, para descartar aquellos que tengan indicio de contaminación por bacterias, hongos o levaduras.

Generalmente, a los 2-3 días muestran un buen crecimiento, y a los 5-7 días se hallan totalmente esporulados y en buenas condiciones para posteriores pases a otros medios. Una vez terminada la incubación y hasta el momento de su uso, se conservan permanentemente en nevera.

Cultivos primarios liofilizados.

En determinados casos, para garantizar la inmutabi-

lidad de la cepa, se procede a su liofilización en un aparato adecuado.

La conservación de estos cultivos se hizo con un aparato de liofilización, modelo semi-industrial G-02, Leybold, (figura 1), con una capacidad de evaporación de 50 g. de hielo/hora, provisto de una campana con 88 conexiones especiales de goma, en las que se pueden adaptar otros tantos tubos, susceptibles de liofilizarse simultáneamente.

Se emplean tubos de vidrio de 6 x 100 mm. de paredes gruesas, especiales para la liofilización, y leche descremada estéril, natural o preparada a partir de leche descremada en polvo.

Considerando que hay una gran pérdida de viabilidad - en los tubos liofilizados, es necesario partir de cultivos primarios - bien esporulados en agar inclinado. Todos los pases y transferencias descritos en este apartado, se hacen con técnicas estériles, en un - cuarto de esterilidad, o al menos en una zona blanca.

Se añaden al tubo de cultivo primario de 2 á 3 ml. de leche descremada estéril. Con un asa estéril se raspa la superficie del cultivo para suspender los esporos en la leche, agitando bien, para homogenizar la suspensión. A continuación, con una pipeta Pasteur estirada finamente, se distribuye esta suspensión en los tubos espe-

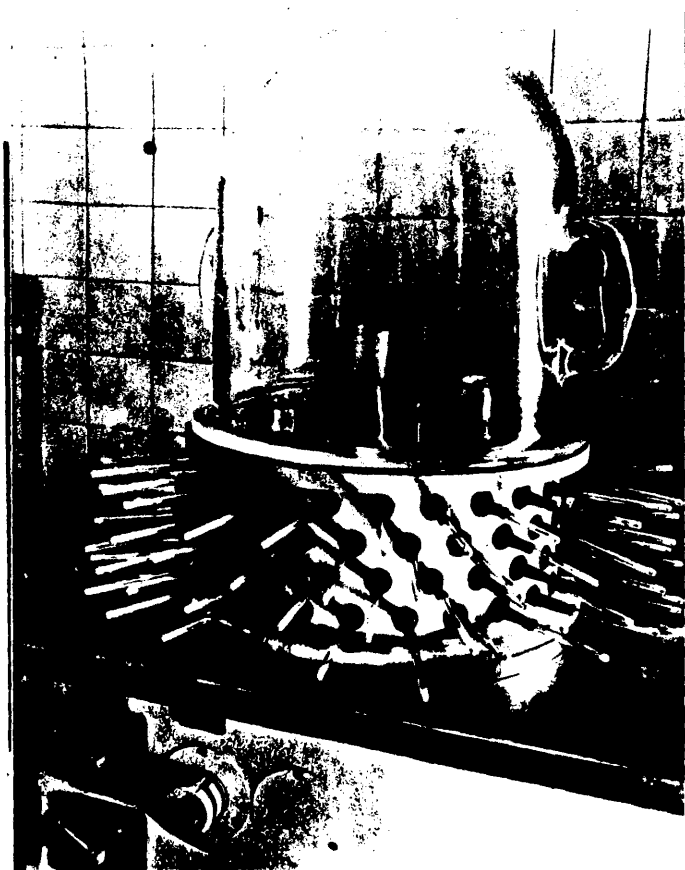


Figura 1

ciales estériles poniendo cuidado de depositar el líquido en el fondo de ellos, sin manchar las paredes, ya que si se mojan con la suspensión, no se puede lograr después una "pastilla" bien liofilizada, esto es, suelta y movable a lo largo del tubo y, por tanto, fácilmente deslizable del mismo en las siembras ulteriores.

La cantidad de suspensión que se distribuye es aproximadamente de 0,1 ml. En cualquier caso la altura del líquido en el tubo debe ser menor del doble de su diámetro, si se quiere que el proceso de liofilización transcurra sin que el producto se descongele; no se debe olvidar que hay siempre una relación entre la superficie de evaporación y el espesor del líquido que se deseca.

Una vez preparados los tubos, se congelan con una mezcla de nieve carbónica y acetona y después se conectan uno a uno al aparato de liofilización en funcionamiento, es decir, trabajando en alto vacío. De esta forma, el vacío provoca inmediatamente una evaporación rápida, que mantiene la congelación del pequeño volumen de suspensión en cada tubo.

Cuando todos los tubos están conectados, el proceso de liofilización sigue su curso hasta lograr la desecación total por sublimación del hielo de la suspensión congelada. Esta, una vez seca, forma en los tubos una pequeña pastilla de aspecto esponjoso, que

ocupa el mismo volumen aparente que el líquido de partida y que se desliza fácilmente a lo largo de sus paredes.

Los tubos liofilizados, colocados en el liofilizador, se cierran a la llama de un soplete, en cuyo momento quedan desconectados del aparato.

Se hace una prueba de pureza y esterilidad con la décima parte de los tubos liofilizados tomados al azar, y por separado. Si los resultados de esta prueba son satisfactorios, respecto a contaminantes extraños, se conservan en nevera para su utilización ulterior como cultivos primarios.

3.1.2. Preparación de inóculos

Este apartado se desarrolla más ampliamente en 3.2.1. al detallar los pasos de preparación de inóculos, y la técnica general empleada. Normalmente se utilizan, o inóculos de los empleados en los fermentadores de 8 lts., o matraces preparados especialmente.

A partir del cultivo de origen se hace con técnica estéril, una siembra abundante en dos matraces con el medio elegido. Estos dos matraces llamados de siembra, se incuban en agitación a

220 r.p.m. y 28º C. ($\pm 0,5^\circ$) durante 24 ó 48 horas. Pasado este periodo se comprueba microscópicamente su pureza y esterilidad, respecto a contaminaciones por bacterias, hongos o levaduras.

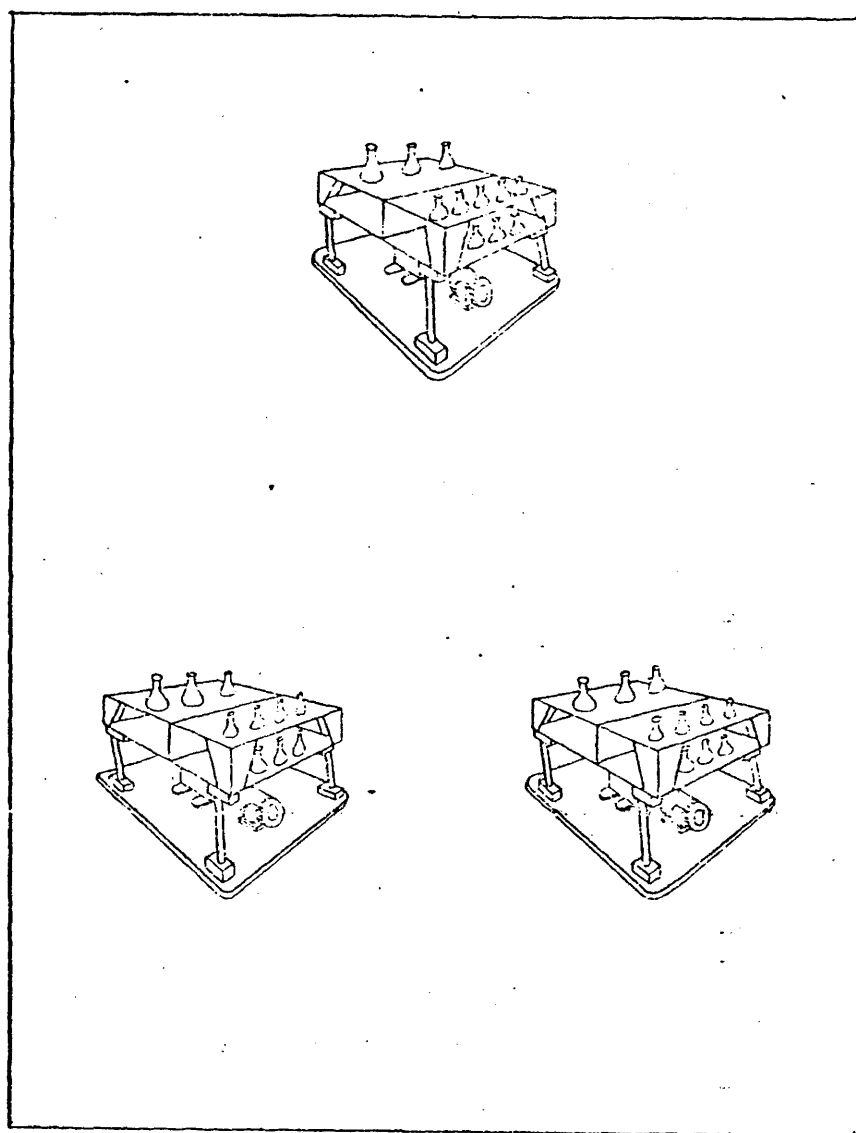
De los matraces de siembra se selecciona uno de ellos, teniendo en cuenta los datos microscópicos y el aspecto de su crecimiento. A partir de este matraz, se inoculan los seis preparados con cada medio de prueba.

3.1.3. Fermentación en el Laboratorio - Matraces de agitación.

Al ser la mayoría de los Actynomicetos, microorganismos estrictamente aerobios, se debe suministrar a la fermentación el oxígeno necesario para su metabolismo y crecimiento. En general las condiciones óptimas de crecimiento se consiguen en el Laboratorio, sometiendo a los cultivos durante su incubación, a una conveniente agitación.

Mesas de agitación.

Cada mesa, (figuras 2 y 3), está compuesta esencialmente de una placa base y dos tableros superpuestos, en los que se colocan los frascos o matraces cargados con el medio fermentante.



F i g u r a 2



Figura 3

El motor transmite el movimiento a un reductor que permite variar la velocidad de la mesa entre 120 y 220 r.p.m., Todos los puntos de los tableros, y por consiguiente, los frascos o matraces fijados a ellos, describen un movimiento circular cuyo radio de giro es de 25 mm. y cuya frecuencia es igual a la del eje del reductor, es decir, entre 120 y 220 r.p.m.

Las mesas de agitación están instaladas en cuartos diferentes acondicionados a 28° C. y 37° C. para poder trabajar a ambas temperaturas según necesidades.

Fermentación en matraces.

El método descrito sirve para dos fines principales; uno, la obtención del caldo fermentado en cantidad suficiente para su ensayo en diversas pruebas conducentes a la caracterización de la sustancia o sustancias activas y, otro, determinar cual de los medios de fermentación utilizados en los estudios de los enzimas proteolíticos resulta más adecuado para obtener una mayor productividad.

La fermentación en matraces se realiza en matraces de Erlenmeyer de 250 ml. Esta fermentación requiere 6 unidades para cada medio de fermentación.

Estos matraces se incuban también en agitación a -

220 r.p.m. y $28^{\circ}\text{C}(\pm 0,5)$, durante tres ó mas días. Al final de esta fermentación se hacen en los caldos las siguientes determinaciones:

- Comprobación microscópica de pureza y esterilidad, mediante frotis teñidos por el método de Gram. pH. Determinación de azúcar.
- Prueba de pureza y esterilidad por diseminación en placa.
- Valoración, frente a una curva patrón, para determinar la actividad proteolítica.

hh

3.2. Planta Semipiloto. Fermentadores de ocho litros.

Si los enzimas producidos en los caldos de fermentación de matraces cumplen los requisitos necesarios, se prosigue el trabajo de fermentación, ahora en mayor escala.

La fermentación se lleva a cabo entonces, en un equipo de fermentadores de ocho litros, con una técnica que imita fielmente a las grandes fermentaciones de tipo industrial.

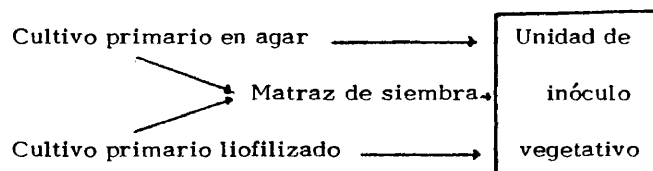
Por consiguiente, esta fermentación requiere una preparación de inóculos en laboratorio, un equipo especial, un suministro de aire estéril y una técnica en consonancia con los volúmenes que se manejan y las características del equipo.

3.2.1. Preparación de inóculos.

La preparación de inóculos para la siembra de los fermentadores de ocho litros, es prácticamente igual a la seguida para preparar los inóculos de los fermentadores más grandes de la planta piloto.

Su objeto es conseguir, a partir de un cultivo esporulado ó liofilizado, una cantidad suficiente de crecimiento vegetativo suspendido en un medio líquido, para que se pueda iniciar, vigorosa y rápidamente, la fermentación en los volúmenes, relativamente considerables, de medio de cultivo estéril, de los fermentadores de producción.

La inoculación se hace, partiendo de un cultivo primario en agar, o liofilizado, si bien a veces se intercala un pase a través de un matraz llamado de siembra. Se opera, pues, según este esquema:



Los pases y transferencias se hacen, rutinariamente, - en un cuarto de esterilidad que está sometido permanentemente a la acción esterilizante de lámparas ultravioletas, excepto durante el periodo de trabajo, y está equipado con un suministro de aire estéril.

Aparte del material corriente en un laboratorio de bacteriología, se emplean además:

Matraces de Erlenmeyer de 250 ml. preparados con 50 ml. del medio de siembra elegido, que se utilizan como matraces

de siembra intermedios, cuando la técnica así lo requiere. Matraces esféricos de fondo plano, de 2.000 ml. de capacidad, frascos "Florence" (figura 4), con una tubuladora lateral y tres hendiduras equidistantes en el borde circular de su base. Estas unidades con 600 ml. del medio de siembra elegido, sirven para la preparación directa o a través de un matraz de siembra, del inóculo vegetativo final.

Preparación de las unidades de inóculo estériles.

Los frascos "Florence" de dos litros se preparan, fijando en su tubuladora lateral un tubo de goma de unos 15 cms. de largo, de cuyo otro extremo pende una campana de inoculación de vidrio (figura 4). El matraz se tapa con un tapón de algodón graso bien ajustado, recubierto de doble capa de gasa. El tapón se sujeta al cuello del matraz con una banda de goma. La campana de inoculación se recubre con una bolsa de tela provista de cintas que se atan sobre el tubo de vidrio terminal de la campana.

Los frascos "Florence" así preparados, con la campana de inoculación colgando libremente para evitar dobleces del tubo de goma, se esterilizan en vacío media hora a 121° C. y 1 kg. de presión. Luego se cargan por la boca con 600 ml. de medio de siembra y se esterilizan otra vez a 121°C. y 1 kg. de presión, durante 20



Figura 4

minutos. Una vez estériles, se sujeta la campana de inoculación al cuello del matraz, mediante una banda de goma, y se les adhiere una etiqueta, donde consta la fecha de su preparación y esterilización.

Inoculación de los matraces intermedios de siembra

Si la inoculación se hace a partir de un cultivo liofilizado, se reúnen en el cuarto de esterilidad los elementos necesarios siguientes :

- Los tubos liofilizados que se van a sembrar.
- Matraces de siembra estériles.
- Una placa de Petri con solución de fenol al 5%.
- Sierras de cortar ampollas
- Una bombona con compresas de gasa estéril.

En el tubo liofilizado se hace con una sierra una pequeña marca en su centro y se sumerge en la solución de ácido fénico unos 5 minutos. Después se envuelven sus extremos en gasa estéril y se parte por la señal de la sierra, cuidando de no dejar caer su contenido. Se procede a abrir con técnica estéril el matraz de siembra, sobre el que se deja caer la pastilla liofilizada.

Si la inoculación se hace a partir de un cultivo de agar, el pase se hace también en el cuarto de esterilidad, tomando con técnica estéril un asa del cultivo esporulado y pasándola a los matraces de siembra.

Una vez inoculados los matraces de siembra, se colocan en una mesa de agitación a 220 r.p.m. y se incuban 48 horas a $28^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Después de la incubación se hace un examen microscópico del caldo, para determinar pureza y esterilidad en cuanto a contaminantes, desechándose los matraces en los que se advierta la presencia de microorganismos extraños. Se hace también una prueba de esterilidad en placa, cuyos resultados sirven para estimar la pureza y esterilidad del cultivo "a posteriori" de su uso, ya que estos matraces se utilizan siempre como semilla para las unidades de inóculo, inmediatamente de conocerse los resultados favorables de la microscopía.

Finalmente, se hace también una determinación ponderal o turbidimétrica de la riqueza en micelio.

Inoculación de los matraces de inóculo vegetativo.

La siembra de los matraces de inóculo vegetativo puede hacerse a partir de cultivos primarios esporulados, en agar o lio-

filizados. Sin embargo, el método usual consiste en inocularlos con un matraz de siembra, preparado según se describe en el apartado anterior.

La siembra se hace, pasando con técnica estéril 5 ml. del matraz de siembra a la unidad de inóculo estéril.

Una vez sembradas estas unidades de inóculo, se colocan en una mesa de agitación a 220 r.p.m. y se incuban de 24 á 48 horas a 28°C , $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.. Al término de la incubación se realizan las siguientes pruebas:

- Examen microscópico.
- Esterilidad en matraz de caldo rojo fenol en agitación.
- Esterilidad en placa.
- Determinación cuantitativa del micelio.

Una vez que se ha cumplido el período de incubación y se tienen resultados sobre la pureza del cultivo, las unidades de inóculo vegetativo se utilizan a su vez como siembra para la inoculación de fermentadores de ocho litros o de los fermentadores más grandes en la Planta Piloto.

3.2.2. Fermentadores de ocho litros

La fermentación de volúmenes de caldo, mayores de los que tienen cabida en el material de vidrio usual en un laboratorio de microbiología, requiere un equipo especial que, en esencia, reproduce a pequeña escala toda la complejidad de servicios e instrumentación necesarios en la fermentación industrial de grandes volúmenes de medio fermentante.

Para la realización de estos ensayos, se han utilizado 24 fermentadores de ocho litros unidos en grupos de seis (figura 5), y formando así 4 unidades mayores.

Unidades Semipiloto

Cada grupo de 6 fermentadores de 8 litros constituyen las llamadas "unidades semipiloto", y están divididos en dos grupos de 3 fermentadores. La "unidad semipiloto", cuyo aspecto se puede ver en la (figura 6), consiste en dos baños termostáticos, contruidos en acero inoxidable. Cada baño tiene capacidad para alojar tres fermentadores de 8 litros. La temperatura del agua se regula con una resistencia eléctrica y un termostato.

En cada "unidad semipiloto" se puede llevar a cabo dos grupos de tres fermentaciones en condiciones diferentes para cada uno

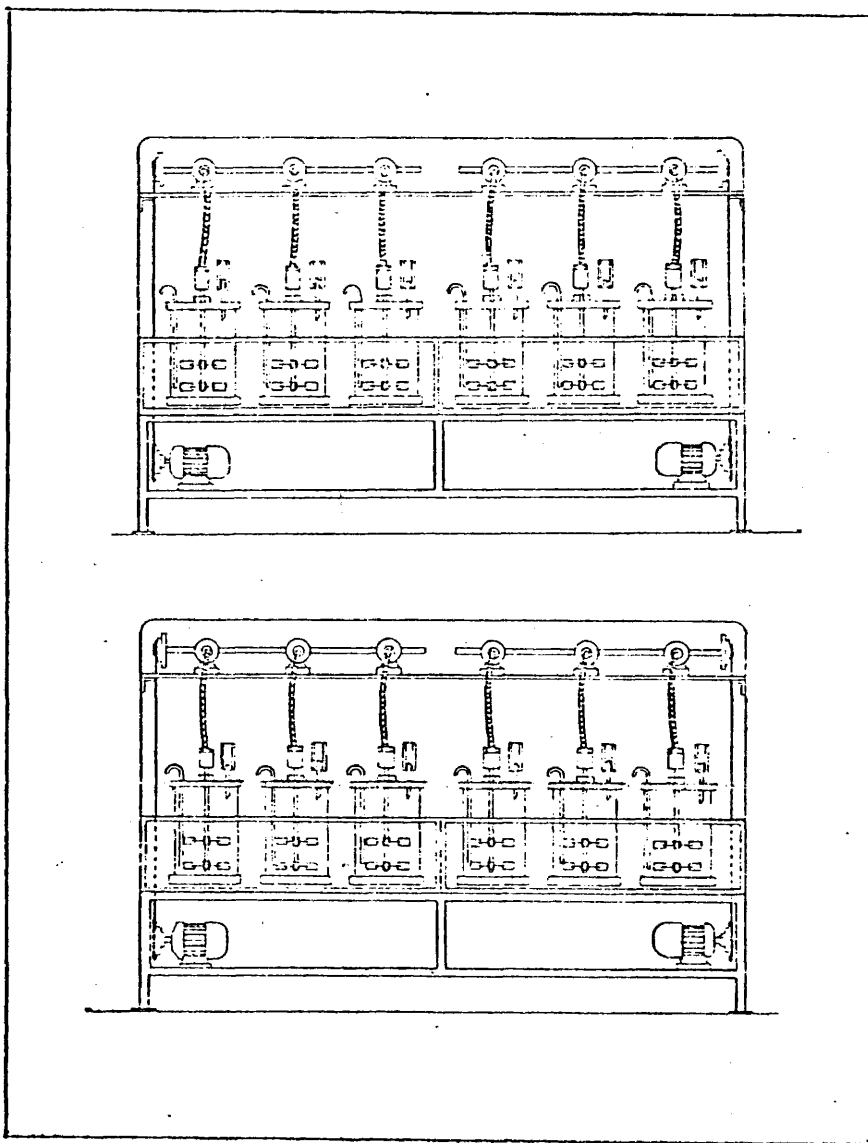


Figura 5

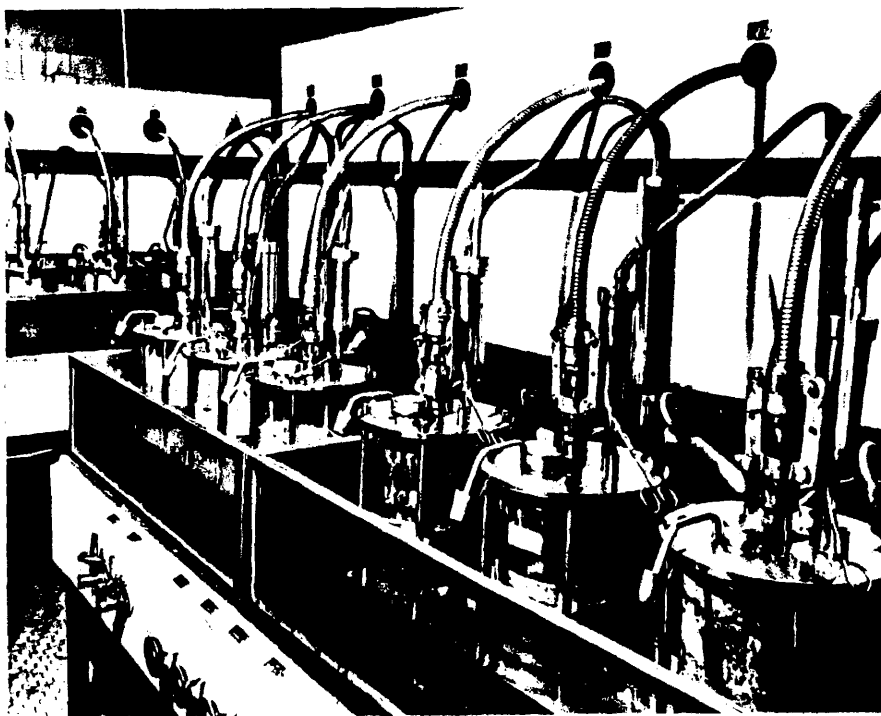


Figura 6

de ellos. Es posible variar por ejemplo la temperatura de incubación, de cada uno de los dos baños termostáticos, ó la velocidad de agitación, de 300 á 900 r.p.m., ya que cada grupo de fermentadores tiene su eje de accionamiento independiente.

Descripción de los fermentadores de 8 litros.

El fermentador, (figura 7), está formado por un cuerpo, una base y una tapa: el cuerpo contiene el caldo de fermentación, la base mantiene el fermentador en el baño termostático de la unidad y la tapa cierra el fermentador y soporta el agitador, la carcasa del termómetro, la entrada y salida del aire, el dispositivo toma-muestras, la boca de carga y los tubos para adiciones durante la fermentación. - Son de acero inoxidable la tapa y todas las piezas y accesorios metálicos, en contacto con el caldo o el aire estéril.

El cuerpo del fermentador es un vaso cilíndrico de vidrio Pyrex, de 188 mm. de Ø y 300 mm. de altura, con el borde bien esmerilado para asegurar un cierre hermético con la tapa.

La tapa del fermentador, (figura 8), es de chapa de acero inoxidable de 10 mm. de espesor y 240 mm. de Ø, con una ranura circular de 10 mm. de ancho y 4 mm. de profundidad, (figura 9), - en la que se aloja una junta de goma. La tapa lleva unidos los elementos auxiliares del fermentador necesarios para el trabajo. Todas las -

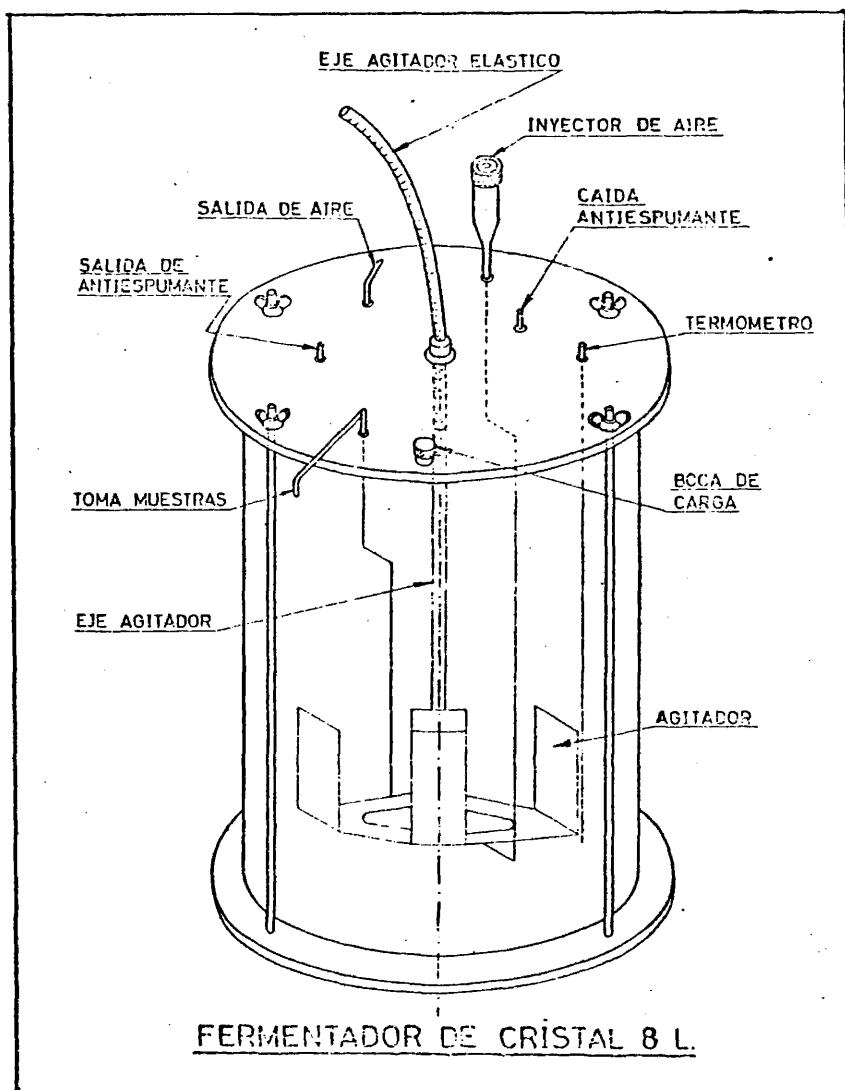


Figura 7

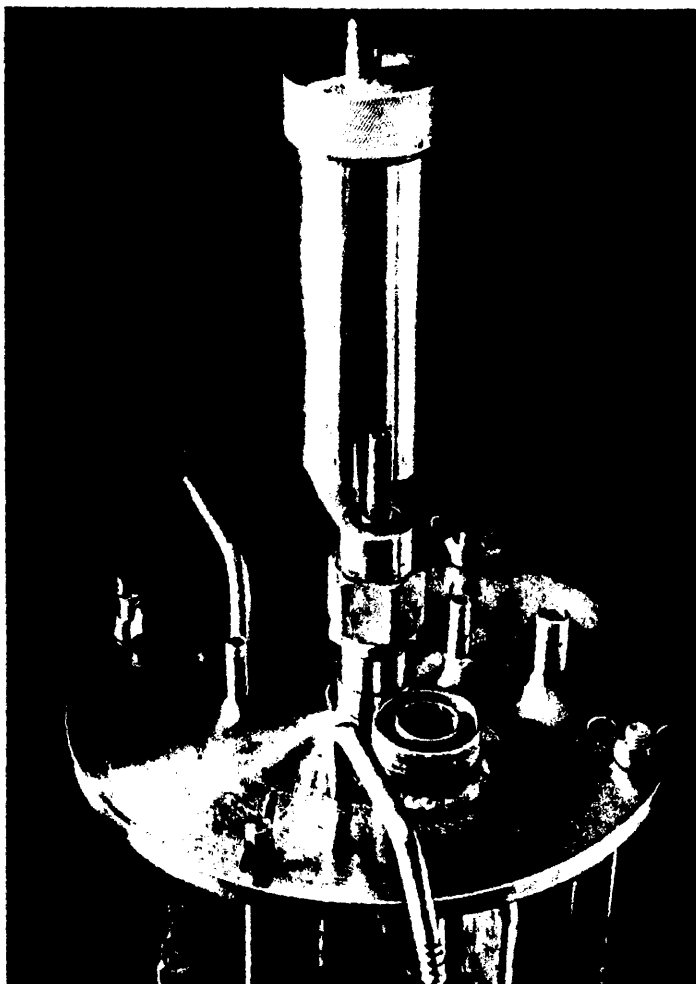


Figura 8

tuberías de servicios que atraviesan la tapa, están unidas a ella, con soldadura de acero inoxidable.

El eje central lleva las hélices que proporcionan la agitación necesaria. Los cojinetes y empaquetaduras están alojados en una caja cilíndrica alargada, para evitar contaminaciones a lo largo del eje; el diámetro del eje es de 9 mm. y su longitud 365 mm.

Los dos agitadores que lleva el eje, son rodetes-turbina con un diámetro total de 100 mm. (figura 9). Cada rodete es un disco en el que van soldadas cuatro paletas curvas en posición vertical de 10 mm. de altura y aproximadamente 30 mm. de longitud. Los rodetes pueden desplazarse a lo largo del eje para darles altura variable.

Adosados a la pared del vaso y colocados en forma vertical, hay tres cortacorrientes, situados a 120° cada uno. Se mantienen en posición correcta, mediante un anillo con unas entalladuras que las sujeta contra la pared del vaso.

La tubería de entrada del aire (figura 7 y 9), penetra dentro del fermentador unos 40 mm. y termina en una unión con tuerca, donde se acopla un tubo acodado de 7 mm de \varnothing interior que lleva el aire hasta la parte baja del fermentador y le hace salir por una boquilla de este tubo situada exactamente debajo del extremo inferior del eje.

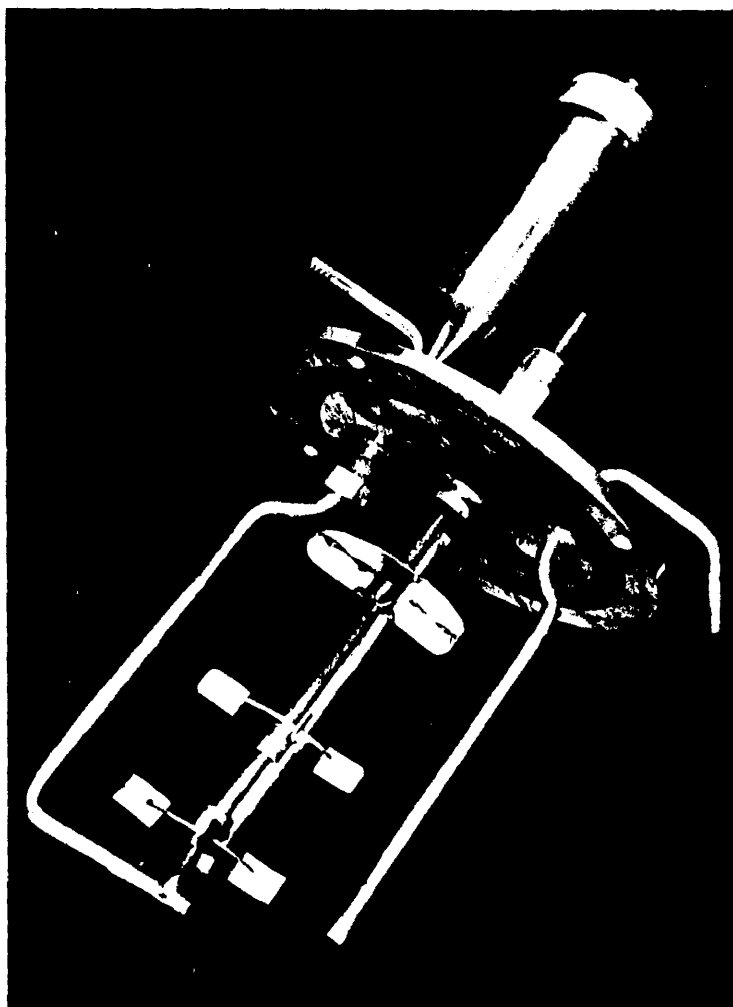


Figura 9

La tubería de salida del aire es un tubo del mismo diámetro, que no asoma al interior del fermentador, si bien atraviesa - todo el espesor de la tapa. Emerge verticalmente unos 4 cm. para doblarse en una rama horizontal de 8 cm. torneada en su extremo para facilitar la introducción de tubos de goma, (figuras, 7 y 9).

La tubería tomamuestras baja, junto a uno de los cortacorrientes, hasta cerca del fondo. Para facilitar la conexión en el exterior, el tubo está prolongado por encima de la tapa, doblado hacia afuera y torneado en su extremidad, (figuras 7 y 9).

Los tubos para las adiciones atraviesan la tapa del fermentador; son dos y están implantados a ambos lados del eje del fermentador, emergiendo verticales en una extensión de 3 cms., con su extremo torneado, para facilitar la introducción de tubos de goma.

La boca de carga, bien visible en la figura 8, está formada por un tubo de acero inoxidable roscado en su parte superior y externa para recibir una tapa que lleva la rosca hembra. En su interior alberga otro tubo de 23 mm. de diámetro. Toda la luz interior de este segundo tubo se abre al interior del fermentador. Entre su superficie externa y la interna del primer trozo de tubo, queda una corta camisa cilíndrica en la que puede encajar la campana de inoculación de -

las unidades de inóculo en el momento de la siembra, para asegurar la esterilidad de la operación. Así, la boca de carga sirve, además, de boca para el inóculo.

Sistema de suministro de aire estéril.

Las fermentaciones aerobias, tanto las que se realizan en fermentadores de 8 litros como en los fermentadores más grandes de planta piloto, requieren un suministro continuo de aire estéril. Por tanto, la cantidad, calidad y continuidad de este suministro son otras tantas condiciones fundamentales para una fermentación regular.

La cantidad debe ser suficiente para proveer el caudal necesario exigido por el proceso. En cuanto a calidad, el aire debe ser limpio y estéril. La continuidad del suministro no debe interrumpirse por períodos mayores de 10-15 minutos, ya que los cortes de mayor duración tienen de ordinario una acción muy perjudicial sobre la fermentación.

El aire para los fermentadores de 8 litros pasa en primer lugar por dos filtros primarios que trabajan alternativamente por períodos de 3-4 días. El material filtrante que llevan es carbón activo y se esterilizan con vapor a presión antes de entrar en servicio.

Cada fermentador va provisto con un segundo filtro se-

cundario, que se conecta fácilmente a los fermentadores (figuras 8, 9 y 10), y que se esterilizan en el autoclave, desmontados, con los fermentadores. El filtro secundario de cada unidad semipiloto, junto con las tuberías metálicas fijas, dependientes del mismo, se esterilizan por vapor a presión, antes del funcionamiento de cada unidad. Los segundos filtros secundarios, se montan en posición, siguiendo técnicas estériles.

Técnica de la fermentación en fermentadores de 8 litros.

Limpieza y comprobación.

Una vez terminada la fermentación y cosechado el caldo fermentado, se procede inmediatamente a desmontar el fermentador en todas sus piezas y a la limpieza minuciosa de éstas, una por una.

Se taponan con gasa las aberturas de entrada y salida del fermentador y el conjunto se esteriliza en un autoclave a 120-130° C., durante 20-30 minutos, como complemento a su definitiva limpieza.

Carga.

La capacidad útil de fermentación es de 4,5 á 5,0 litros, que, según el tipo de fermentación a realizar, se utiliza parcial

o totalmente desde el principio, según haya o nó que hacer adiciones durante el curso del proceso.

Los medios utilizados vienen determinados por los resultados obtenidos previamente en fermentaciones previas.

Los caldos de fermentación se preparan fuera del fermentador, en un vaso o recipiente de tamaño adecuado, con las materias primas exigidas por la composición del medio elegido. Se ajusta el pH al valor requerido, mediante adiciones pequeñas de sosa al 34%, o de ácido fosfórico de 75%, según convenga. La comprobación y ajuste final se hace siempre electrométicamente con electrodo de vidrio.

El fermentador se prepara colocando el vaso sobre su base metálica, enhebrando la tapa por las cuatro varillas verticales de aquella y roscando las correspondientes palomillas que después se aprietan para hacer un cierre hermético.

El medio de cultivo preparado, se pasa al fermentador por la boca de carga, tras de lo cual se cierra ésta con un tapón de algodón no absorbente recubierto de gasa y protegido por fuera con una doble capa de papel fuerte. La tapa metálica roscada de la boca de carga se esteriliza aparte, envuelta en gasa y papel.

A continuación, se acoplan a la tapa del fermentador los accesorios necesarios para la fermentación, que son los siguientes:

Un filtro secundario de acero inoxidable cargado de vitrofil, que va roscado a la entrada del aire del fermentador y en posición vertical. La entrada superior de este filtro se protege recubriéndolo con gasa y papel. Dos matraces unidos entre sí y acoplados por unos tubos de goma a la salida del aire; uno de ellos está vacío y sirve para retener los reboses de espuma y caldo y el segundo lleva una solución de fenol al 2%, o bien se llena con vitrofil (figura 10). El extremo del tubo de salida de este segundo matraz se protege también con gasa y papel.

La entrada a la carcasa del termómetro, aunque es ciega, se tapa con algodón para evitar que recoja agua durante la esterilización. Las entradas de los tubos para adiciones también se tapan con gasa y papel.

El aspecto de un fermentador preparado para la esterilización, aunque sin carga, es el de la figura 10.

Esterilización.

El autoclave usado para la esterilización de los fermentadores

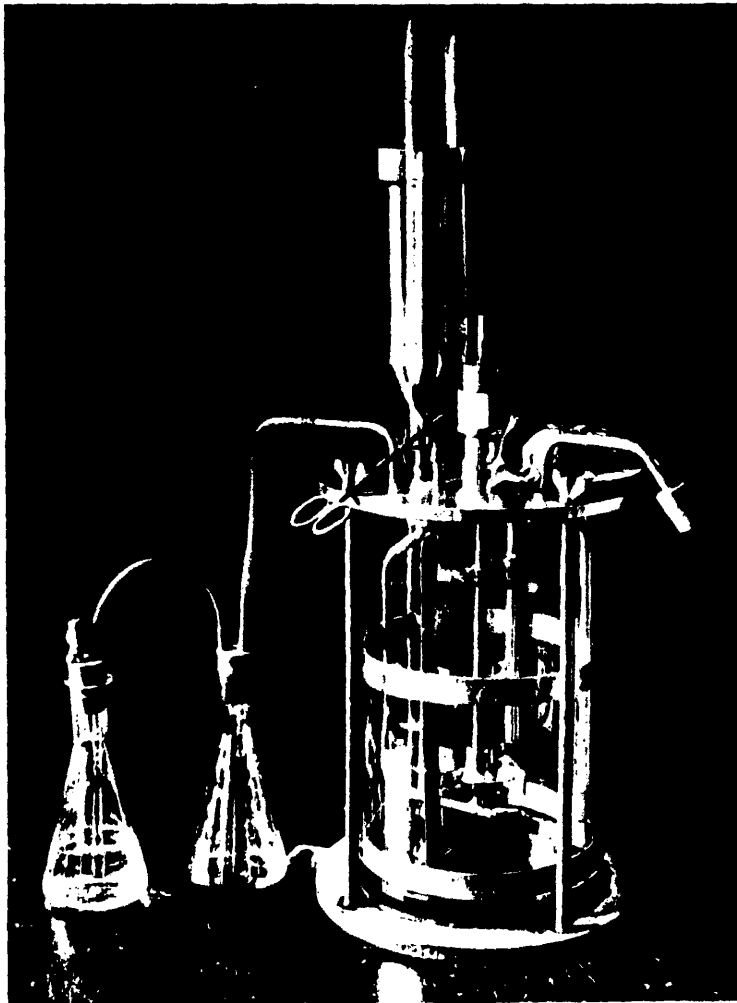


Figura 10

tadores de 8 litros, es de sección rectangular alargado en su plano horizontal. Interiormente está revestido de acero inoxidable. Tiene una capacidad suficiente para esterilizar simultáneamente 6 fermentadores con todos sus accesorios.

La esterilización de estos fermentadores requiere especiales cuidados, por varias circunstancias, tales como su relativamente considerable volumen, el espesor de las paredes de los vasos de vidrio Pyrex, y la naturaleza de los medios que llevan, muchas veces, sólidos en suspensión que con el reposo se depositan en el fondo de los vasos formando una gruesa capa. Debido a estas causas, todas ellas desfavorables, la transmisión del calor del vapor del autoclave, al conjunto del fermentador se hace con mucha lentitud, de forma que los aparatos ordinarios de medida del ambiente del autoclave, manómetro y termómetro, no indican en cada momento la temperatura real conseguida en el medio. Unicamente lo hacen después de haberse llegado a un equilibrio total en el sistema, lo cual requiere un tiempo considerable.

Para obviar este inconveniente, el autoclave lleva, además de su instrumentación corriente, un termómetro registrador de lectura directa de la temperatura del interior de los fermentadores durante la esterilización, mediante unos bulbos de forma adecuada que se

introducen por la boca de carga hasta el seno del medio de cultivo, -
equipados con sendos pares termoeléctricos, y prolongados con conduc-
tores aislados que atraviesan la pared del autoclave y llegan hasta el -
aparato de lectura y registro. Las lecturas de este termómetro son las
que regulan la marcha y los tiempos de la esterilización.

El curso de ésta debe ser inicialmente muy lento hasta
llegar a una temperatura de 85° , para evitar dilataciones bruscas del
vidrio de los vasos que puedan dar lugar a roturas. Una vez alcanza-
dos los 85°C . se acelera el proceso para llegar rápidamente a la tem-
peratura de esterilización que es de 121°C ., manteniéndola durante -
20 - 30 minutos, según los medios, y procediendo después al enfria-
miento, que se hace también con lentitud a partir de los 85°C ., para
evitar la rotura del material.

En conjunto, la calefacción y enfriamiento deben hacer-
se con la mayor pausa posible, cuando la temperatura sea menor de
 85°C y rápidamente cuando sea mayor, ya que la calefacción prolon-
gada por encima de este límite, disminuye la potencialidad productiva
de los medios de cultivo.

Normalmente, para esterilizar durante 20-30 minutos
un grupo de fermentadores a 121°C leídos en el termómetro directo -
del caldo, los aparatos de medida corrientes del autoclave llegan a la

temperatura de 130º C. y la mantienen durante 30-45 minutos, con un período previo de otros 30 minutos de calentamiento.

3.2.3. Fermentación

Puesta en marcha y siembra.

Los fermentadores de 8 litros, preparados y esterilizados, se colocan en los baños termostáticos y, una vez fijos en ellos, se procede a establecer las conexiones necesarias para la agitación, y entrada y salida del aire.

La entrada del aire se hace con técnica estéril y mediante un tubo de goma que enlaza uno de los terminales de la instalación de aire estéril con el pico superior del filtro secundario cargado con vitrofil, que va roscado a la tapa del fermentador. La salida enlaza también con tubo de goma, al extremo del tubo de entrada de un rotámetro destinado a medir el caudal de aire que pasa a través del medio durante la fermentación. Todos estos detalles pueden observarse en la figura 6, que reproduce una unidad semipiloto con sus seis fermentadores trabajando en una fermentación.

Una vez realizadas estas conexiones, se procede a la siembra, la cual se ejecuta de la forma que sigue:

Se prepara el matraz de inóculo vegetativo, quitándole la protección que cubre la campana de inoculación. Esta campana debe mantenerse junto a la llama de un mechero de gas, mientras se separa el papel que protege la tapa de la boca de inoculación del fermentador y se retira rápidamente el tapón de algodón colocado para la esterilización. En condiciones estériles y flameando con el mechero de gas, se acopla la campana a la boca del fermentador y se procede a la descarga de parte o del todo del contenido de la unidad de inóculo, según que ésta haya de servir para sembrar uno o varios fermentadores, (figura 11).

Con las mismas precauciones que antes se protege contra una posible contaminación el resto de inóculo que queda en el matraz, para hacer con él una prueba de esterilidad de la unidad después de la siembra.

A continuación, se ponen en marcha inmediatamente la agitación y la aireación, en las condiciones de velocidad y flujo establecidas para la fermentación correspondiente.

Incubación.

La fermentación se mantiene regularmente durante varios días consecutivos, en las condiciones establecidas.

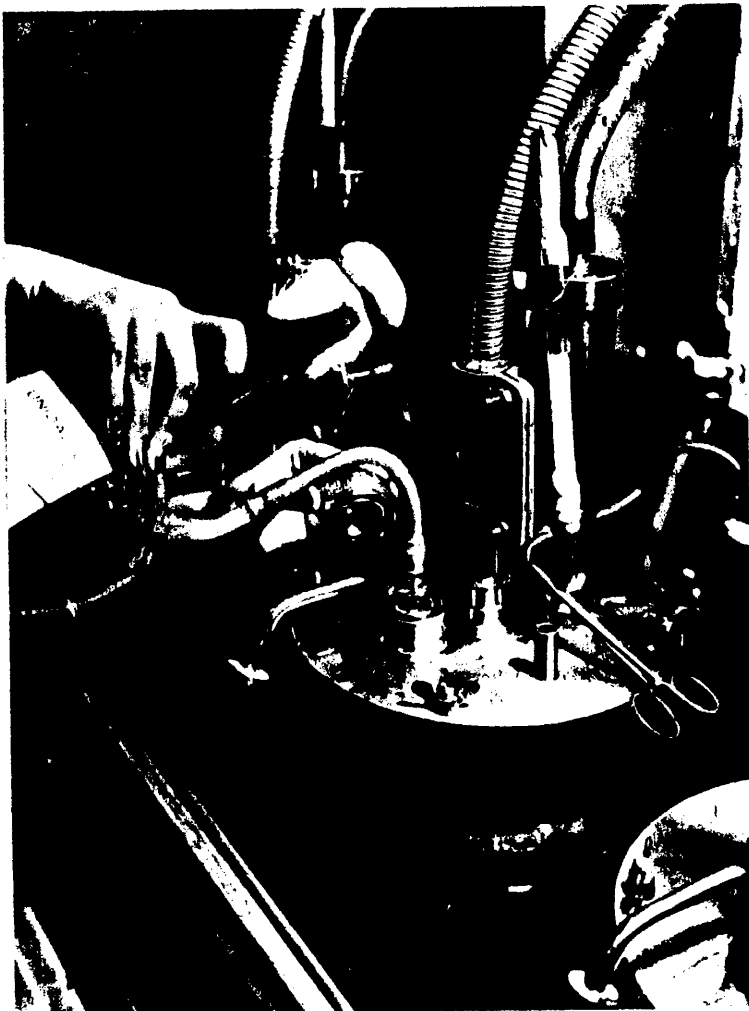


Figura 11

La agitación se regula a la velocidad deseada y se continúa durante todo el proceso. El aire estéril se pasa al flujo marcado, también durante toda la fermentación.

A intervalos regulares, de 12-24 horas, se obtienen estérilmente muestras del caldo fermentante, según la técnica que se describe después. Sobre estas muestras se hacen las determinaciones - precisas para seguir el curso de la fermentación, pH, consumo de azúcares, esterilidad y productividad.

Toma de muestras

Las muestras de fermentación a que se refiere el apartado anterior se toman con técnica estéril en la forma que a continuación se describe.

Se utilizan tubos de 22 x 175 mm. con una tubuladora lateral, implantada a unos 4 cm. de la boca, que se dirige hacia abajo formando con el eje del tubo un ángulo de 70°, y que a 3,5 cm. del origen se acoda hacia arriba en ángulo obtuso prolongándose un par de centímetros más, (figura 12).

En esta tubuladora se adapta una extensión de tubo de goma que se prolonga unos 4 cm. más allá de su extremo, la cual se prepara para la esterilización cubriéndola con un tubo de vidrio de -

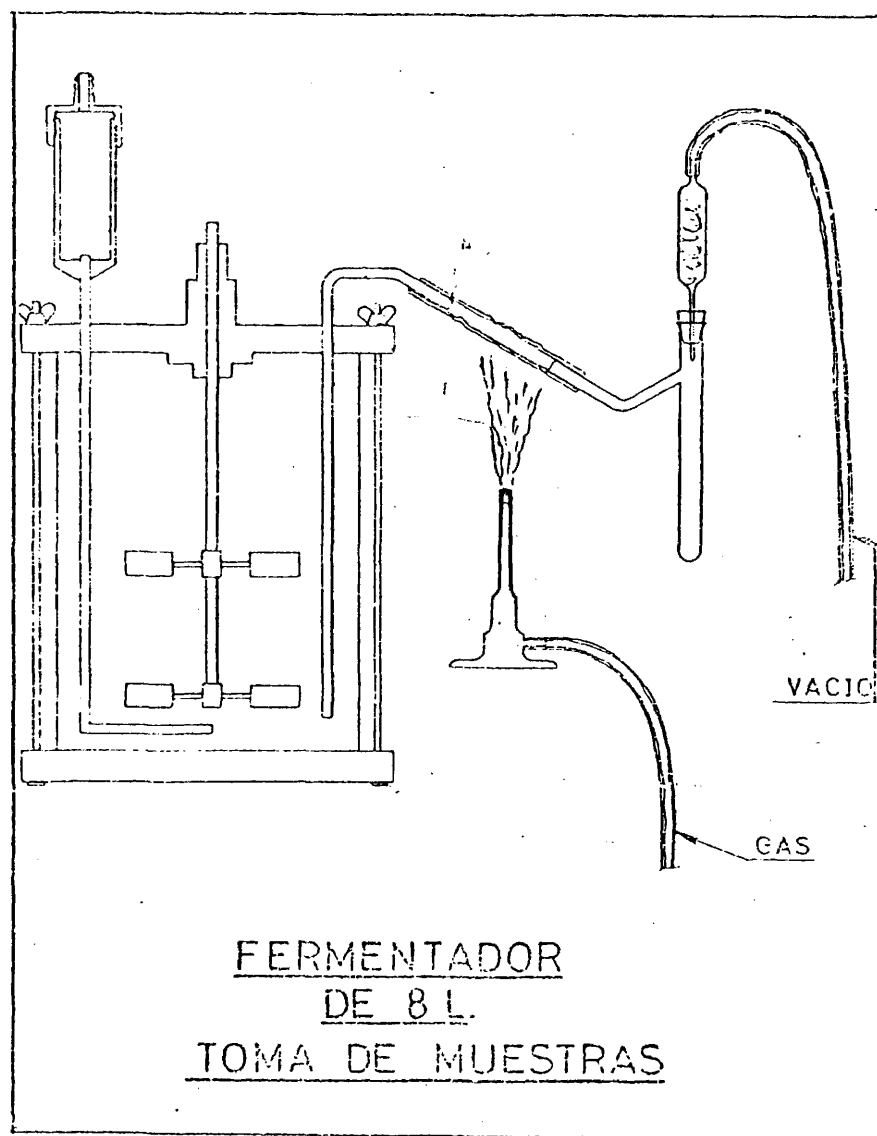


Figura 12

diámetro adecuado. En la boca del tubo se adapta un tapón de goma perforado, por el que pasa un tubo corto que, hacia el exterior, se prolonga en una dilatación llena de algodón o de gasa, que sirve como filtro estéril. El conjunto debidamente preparado, se esteriliza en autoclave, a 121°C y 1 kg. durante 30 minutos.

La salida de la tubería tomamuestras del fermentador, está regularmente embutida en un tapón de goma estéril, como se puede apreciar en la (figura 11). Para tomar una muestra, se quita este tapón y, después de flamear la salida de la tubería, se acopla a la misma el tubo de goma de la tubuladora lateral del dispositivo descrito en el apartado anterior. Inmediatamente, la extremidad del filtro de este dispositivo se acopla a otro tubo de goma, unido al servicio general de vacío, con lo que el caldo del fermentador es aspirado al tubo tomamuestras. Se interrumpe el vacío y se separa el tubo de goma, del fermentador. Se repone inmediatamente el tapón a la salida de la tubería, previo flameado de ésta y de lavar aquel con una solución al 5% de ácido fénico.

Adiciones durante la fermentación. Espuma.

En el curso de la fermentación interesa, a veces, agregar de una forma continua, o discontinua, determinadas sustancias, que unas veces tienen el carácter de nutrientes, otras la de regular y

mantener el pH en límites convenientes, etc., etc.

Además, de forma regular, es necesario añadir sustancias antiespumantes, puesto que es normal que la fermentación genere espuma con lo que se produce pérdida de caldo y riesgo de contaminaciones. En previsión, la tapa del fermentador tiene dos tubos sobre los que se pueden acoplar pipetas especiales de tamaño variable, conteniendo los antiespumantes previamente esterilizados. La conexión se establece con un tubo de goma que lleva una pinza de presión. Actuando sobre ésta, se hace pasar al fermentador la sustancia deseada.

En la hoja registro de fermentaciones se consignan todas las adiciones efectuadas y el tiempo en que se hicieron. Tiene importancia este registro ya que, por ejemplo, algunos antiespumantes tienen acción tóxica sobre el microorganismo si se sobrepasan ciertos límites y pueden afectar y perjudicar por esta causa el proceso de fermentación.

En ocasiones, los dos tubos de adiciones se acoplan para el servicio de dos antiespumantes diferentes, cuyo uso se alterna durante el curso de la fermentación.

3.3. Planta Piloto

A medida que el trabajo se iba definiendo, fué necesario seguir su desarrollo en mayor escala, para poder obtener una cantidad de sustancia cruda suficiente que cubriese los siguientes objetivos: purificar el producto obtenido y proseguir los estudios sobre éstos, que permitieran determinar la actividad y posibilidad de uso.

Por tanto, para obtener mayor cantidad de producto, se pasó a la Planta Piloto en la que, aprovechando todos los conocimientos logrados en el anterior trabajo de laboratorio y Planta Semipiloto se pudo repetir el proceso ya establecido, en una escala más de un centenar de veces mayor, gracias a sus equipos de fermentación, y extracción.

La Planta Piloto imita en todo, a una planta industrial de producción por fermentación, se diferencia fundamentalmente en el tamaño, y en que no está rígidamente adaptada para trabajar según un único proceso preestablecido, sino que tiene flexibilidad suficiente para variar las condiciones de trabajo; sirve por ello también de piedra

de toque experimental, para fijar en definitiva, las mejores pautas para la fabricación en escala industrial. De esta forma, esta Planta ocupa una posición intermedia, sirviendo por una parte, para completar los trabajos, y por otra para iniciar los trabajos de producción industrial, así como para refinar las técnicas y rendimientos de producción.

La Planta Piloto puede definirse como una fábrica "en pequeño" y requiere, por tanto, una instalación en locales adecuados, con todos los servicios de las fábricas propiamente dichas. El departamento de fermentación y el de extracción, forman una sola entidad funcional. Los trabajos que se realizan en la Planta Piloto tienen ya un matiz industrial, bien distinto de los trabajos de laboratorio. Por ello, la instalación, en su conjunto, está provista de los servicios necesarios y de los elementos relativos a la seguridad e higiene del trabajo, tales como un equipo de ventilación y renovación del ambiente para prevenir la formación de atmósferas nocivas o peligrosas.

3.3.1. Fermentadores

Entre los diferentes aparatos de que se compone el equipo de fermentación de la Planta Piloto, los más importantes son los fermentadores, porque en ellos se realiza la operación fundamental del proceso.

Los fermentadores instalados son los siguientes, (figuras 13, 14 y 15).

Un fermentador de 80 l. de capacidad, construido con chapa de acero carbono.

Un fermentador de 150 l. de acero carbono.

Dos fermentadores de 200 l. de acero inoxidable.

Dos fermentadores de 950 l. de acero carbono.

Dos fermentadores de 950 l. de acero inoxidable.

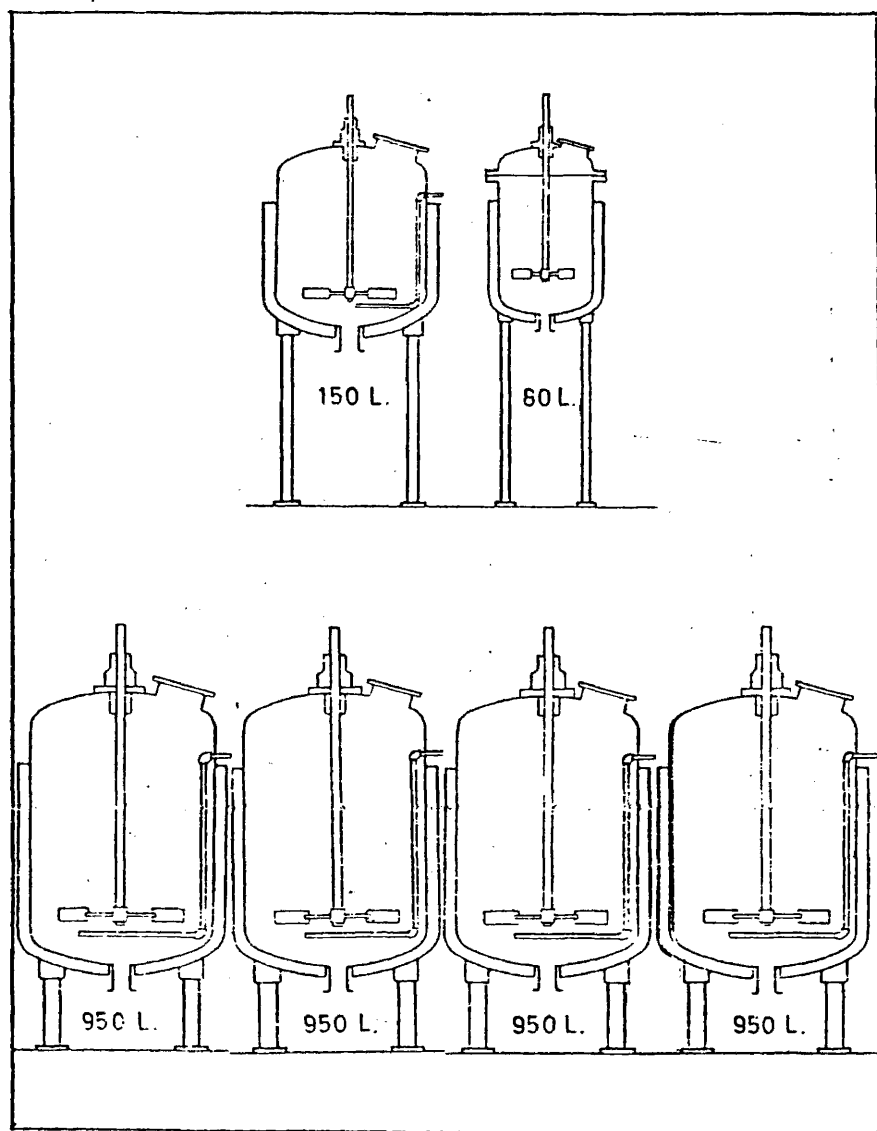
Aunque de diferentes dimensiones, todos los fermentadores son análogos. A continuación se describe uno de los fermentadores de 950 litros.

Técnica de la fermentación en Planta Piloto.

Limpieza.

Antes de poner en funcionamiento un fermentador, hay que proceder a su limpieza minuciosa. Esta operación sirve para completar la limpieza, que habitualmente se hace una vez cosechado el caldo fermentado de la fermentación anterior.

La limpieza comprende tanto el interior, como el exterior del tanque, las tuberías aferentes y eferentes, los aparatos de



F i g u r a 13

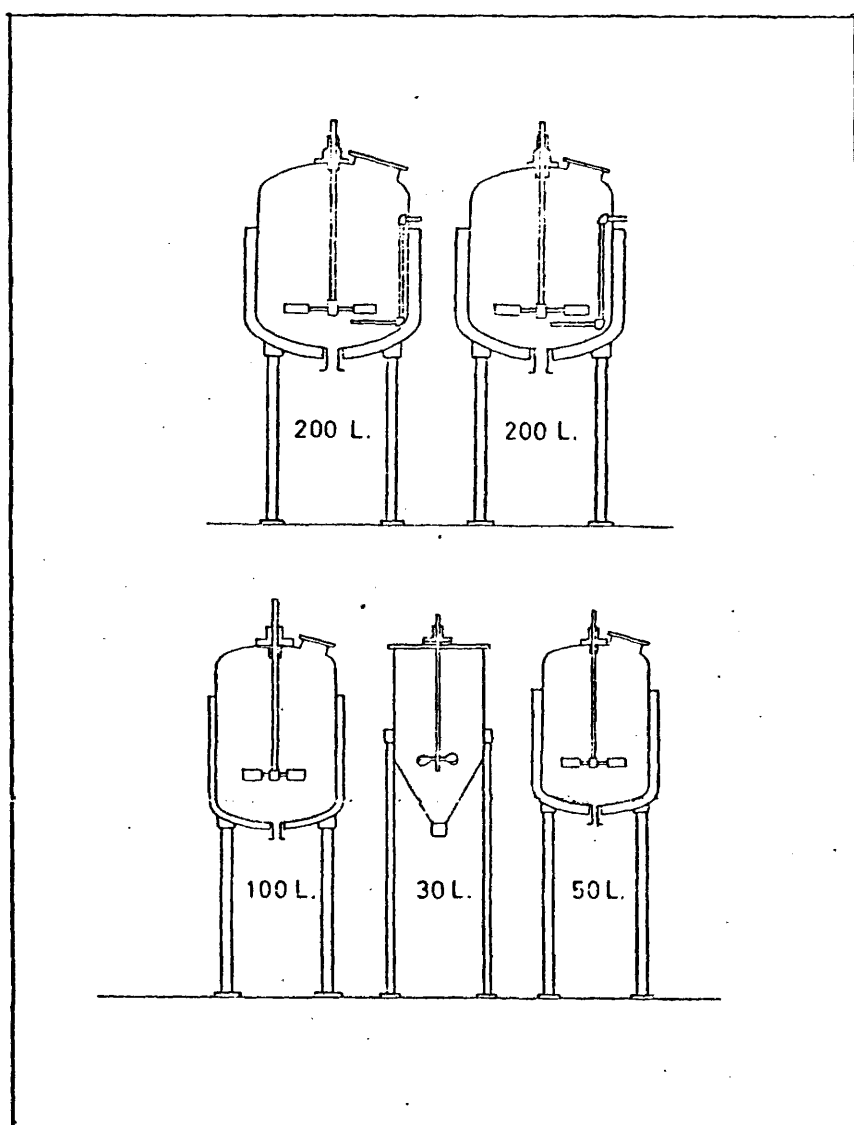


Figura 14



Figura 15

medida y control. y debe eliminar todas las materias y restos de fermentaciones anteriores.

La limpieza interior del tanque se hace por la boca de carga con escobillas metálicas frotando bien las paredes y fondo, y eliminando los desperdicios con el chorro de una manguera, que se evacua por el desagüe inferior.

Después de esta limpieza mecánica, se hace un lavado con una solución diluida de sosa caústica, con la que se llena el tanque hasta su mitad y se ayuda poniendo en marcha el agitador. Finalmente, se vacía el tanque por su desagüe y, con éste abierto, se hace un último lavado con manguera, para arrastrar y eliminar los restos de la solución de sosa.

Comprobación y repaso mecánico.

Una vez limpio el fermentador se procede a la comprobación y repaso mecánico del funcionamiento de todos sus servicios comprendiendo los de agua, vapor, suministro de aire estéril y aparatos de medida y control.

Carga.

En el fermentador, limpio y en condiciones de perfec-

to funcionamiento, se procede a preparar el medio de cultivo adecuado para la fermentación correspondiente.

Primeramente se pone con la manguera una cantidad de agua suficiente para cubrir el rodete del agitador, en cuyo momento se pone en marcha éste. A continuación y en régimen de agitación, se agregan sobre el agua, por la boca de carga, las sustancias sólidas del medio en cantidades previamente pesadas. Después se completa con agua hasta la señal de aforo del volumen previsto, se ajusta el pH al valor convenido, con sosa o ácido sulfúrico, como en los fermentadores de 8 litros y se cierra y asegura la tapa de la boca de carga.

Esterilización.

La carga se esteriliza con vapor a presión que llega al fermentador por la conducción de entrada del aire, a través del filtro secundario correspondiente. Por la salida del aire, se purga el fermentador mientras entra el vapor, hasta que sale un chorro de vapor puro. Se cierra entonces la válvula de salida y se continúa el paso de vapor hasta que el manómetro marca 1 kg. por cm^2 , y la temperatura en los termómetros es de 121°C . A partir de este momento cuenta el período de esterilización de 15 minutos, que es el ordinariamente utilizado. Después se interrumpe el acceso de vapor y se comienza

a pasar agua fría de la conducción, por la camisa del fermentador, pa-
so que se mantiene hasta que la temperatura baja a 28°C.

3.3.2. Fermentación

Las operaciones de inoculación o siembra en la Planta Piloto, son de dos tipos, según se trate de un fermentador pequeño, que se inocula con una unidad de inóculo preparada en el laboratorio, o de un fermentador grande de producción, que se inocula con uno pequeño de siembra.

En el primer caso, o sea cuando se trata de un fermentador de siembra, la inoculación se hace una vez que el medio se ha enfriado a 28°C, manejando la unidad de inóculo del laboratorio, en una operación semejante a la descrita para la inoculación de los fermentadores de 8 litros. Los fermentadores grandes de producción, se inoculan una vez que su carga está estéril y enfriada a 28°C., con la pro-
cedente de un fermentador de siembra, a las 24 horas de su incubación y después de haber comprobado sus condiciones de crecimiento, esterilidad, pH y contenido en azúcar.

El pase o transferencia del inóculo contenido en un fermentador de siembra, a uno o varios fermentadores de producción, se hace mediante presión de aire estéril, a través de la red de tuberías -

de inóculo, manejando convenientemente las válvulas, para gobernar la dirección del caldo, y la cantidad fijada de siembra para cada unidad de producción.

Incubación

Una vez efectuada la siembra, comienza el proceso de fermentación propiamente dicho, tanto se trate de fermentadores de siembra como de producción.

La temperatura del proceso debe permanecer constante con un error de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, en todos los fermentadores. El mantenimiento se hace mecánica y automáticamente y se regula mediante el pase de agua fría de la conducción por la camisa del tanque. La temperatura del proceso queda registrada gráficamente en el teletermómetro y se comprueba continuamente durante el proceso.

La agitación suministrada por el rodete varía según la velocidad de éste. Generalmente los fermentadores pequeños de siembra trabajan a 180-200 r.p.m., mientras que los grandes de producción lo hacen a 120-160 r.p.m. La aireación se lleva a cabo con aire estéril, que a través del correspondiente filtro secundario pasa a cada fermentador.

El flujo del aire se regula también manualmente con la

válvula de salida instalada previamente al rotámetro que continuamente mide el caudal. Según el fermentador, varían el flujo, el volumen de la carga y las condiciones previamente fijadas para cada fermentación. En los fermentadores de siembra oscila entre 30 y 60 litros por minuto, para volúmenes de caldo que fluctúan entre 75 y 125 litros. En los fermentadores grandes el caudal de aire suministrado varía entre 100 y 400 litros por minuto. Para volúmenes de caldo de 300 - 600 litros.

Toma de muestras

Durante toda la fermentación tanto se trate de fermentadores de siembra como de producción, se toman muestras del caldo fermentante a intervalos fijos de 6 horas.

Todos los fermentadores tienen un dispositivo tomamuestras, consistente en un tubo que sale del fermentador y que al exterior remata en una cazoleta invertida provista de un sello de vapor, y habitualmente cerrada con un tapa hermética, ajustada a presión con una palomilla. Antes de la cazoleta, está instalada una válvula que sirve para cerrar o dar salida al caldo.

Se utilizan frascos de vidrio resistente al calor, boca ancha y unos 500 ml. de capacidad. Los frascos se tapan con algodón

y doble capa de gasa y se esterilizan al calor seco. Después se adhiere una etiqueta, donde se han de registrar los datos necesarios para la identificación de la muestra.

Se cierra el paso del vapor al dispositivo tomamuestras, desenroscando después la palomilla de la tapa. Una vez abierta ésta, se abre también la válvula de salida del caldo, dejando perder la primera porción, hasta comprobar que el chorro de caldo sale a su temperatura normal. Entonces, se acerca rápidamente la boca del frasco tomamuestras estéril y se llena aproximadamente hasta su mitad, en cuyo momento se cierra la válvula de salida, e inmediatamente después se tapa el frasco.

A continuación se cierra la tapa del dispositivo, roscando la palomilla correspondiente y dando de nuevo paso al vapor a la cazoleta.

Sobre la etiqueta del frasco tomamuestras se escriben los datos necesarios para identificación de la muestra, la cual se conserva después en la nevera, hasta el momento en que se procede a los análisis pertinentes.

Cargas adicionales - Espuma

Se han reseñado las razones que justifican las adiciones

contínuas o discontinúas de diversas sustancias durante el curso de la fermentación, así como la necesidad de agregar antiespumantes.

La Planta Piloto dispone para este fin de 3 tanques auxiliares, (figura 14), conectados a la red de tuberías de inoculación y cargas. Las adiciones se pueden hacer estérilmente en los momentos que convenga durante la fermentación, por un sistema parecido al ya descrito en la inoculación de un fermentador de producción, con uno de siembra.

Existe, además, un sistema que permite hacer adiciones contínuas o semicontínuas, provisto de dispositivos que regulan el ritmo y volumen de las adiciones.

Las adiciones de antiespumantes se hacen desde unos pequeños tanques, de capacidad adecuada, que están instalados sobre la cubierta del fermentador y conectados a la tubería correspondiente, con una válvula de paso interpuesta. Estas adiciones se hacen muchas veces manualmente si se advierte que la espuma crece continuamente y amenaza con alcanzar la salida del aire del fermentador. Otras veces, se regula la adición en forma continúa para prevenir este peligro.

3.4. Extracción

Los enzimas proteolíticos se recuperan a partir de un proceso de extracción de los caldos fermentados.

Una vez terminada la fermentación, el caldo cosechado se filtra para separar el micelio, el caldo filtrado resultante se somete a un proceso de extracción que se puede desarrollar por técnicas diferentes y en una o varias fases, según conveniencia y rendimientos.

El objeto de realizar el proceso de extracción, además de comprobar las mejoras introducidas en la fermentación y tener confirmación de que los productos obtenidos a partir de estos caldos tenían mayores actividades, es el de adecuar la obtención del producto enzimático con las menores pérdidas.

Este producto se purifica posteriormente para conseguir un nuevo derivado de elevada pureza y gran actividad proteolítica.

3.4.1. Equipo

Los volúmenes finales de los caldos fermentados pro -

cedentes de Planta Semipiloto eran aproximadamente de 3 litros, por lo que prácticamente todas las pruebas de extracción con estos caldos, se hicieron en el laboratorio con los medios normales que se disponen en el mismo.

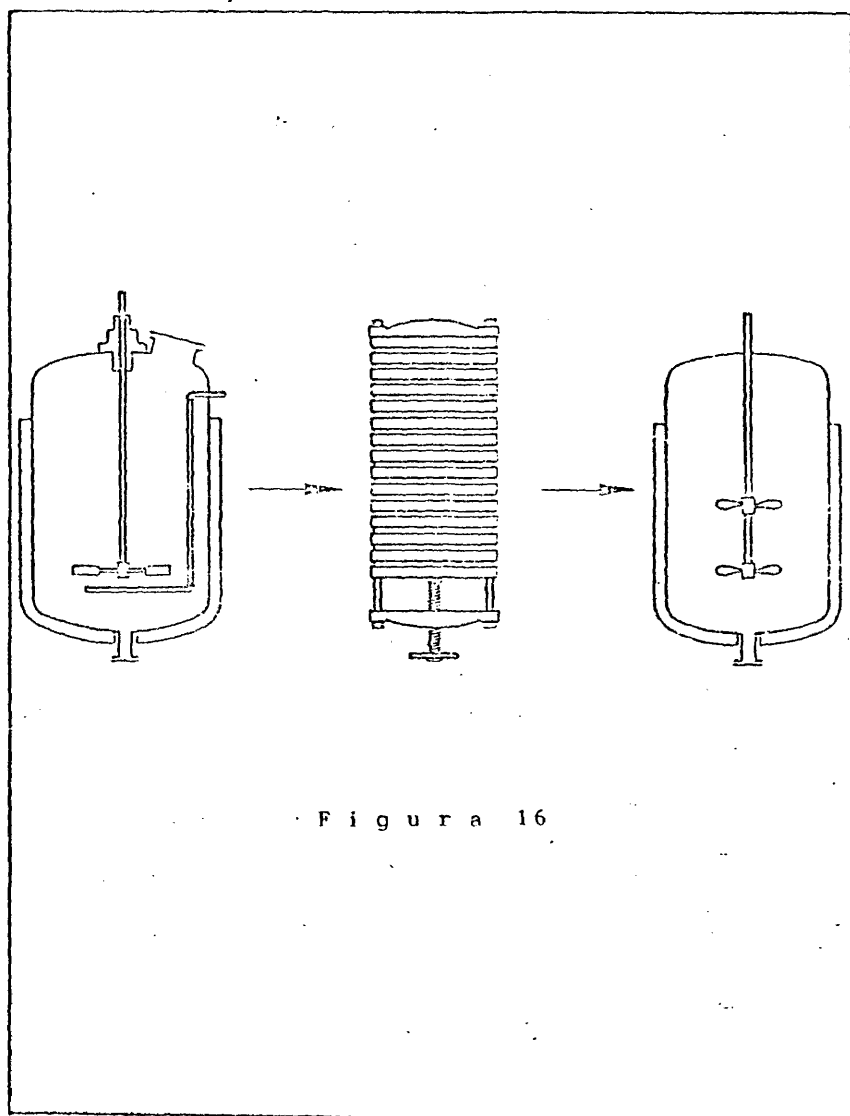
El equipo de extracción de la Planta Piloto, (figuras 16 y 17), consta de los elementos necesarios para realizar todas las operaciones.

La instalación se compone principalmente de :

Dos filtros prensa, con placas de 40 x 40 cms. en material vitrificado o en acero inoxidable.

Diferentes tanques de varias capacidades para la recepción del caldo cosechado, adición de prefiltrante, almacenamiento del caldo filtrado, etc. Estos tanques poseen agitadores y son de acero inoxidable, vitrificados, etc.

La instalación dispone de centrífugas semi-industriales Westfalia, de cámara o de platos, en acero inoxidable y tanques auxiliares de distintos volúmenes para la preparación de los líquidos necesarios en la extracción por disolventes; tampones, soluciones, ácidos, disolventes, etc.



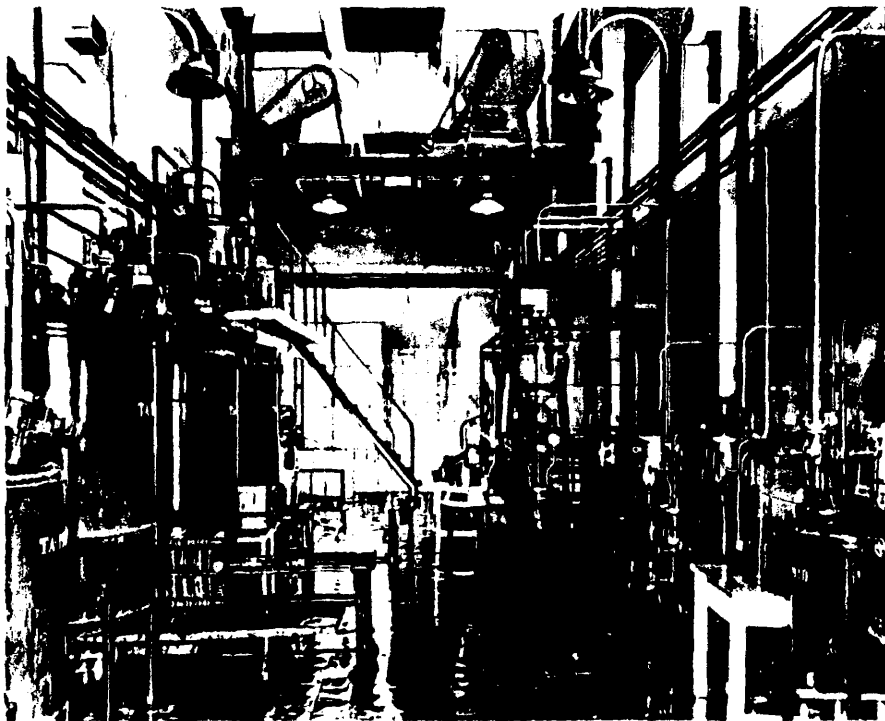


Figura 17

Todo este sistema de extracción por disolventes está semiautomatizado y dispone de los elementos de control suficientes para su correcto funcionamiento: Rotámetros de flujos de líquido, registradores de temperaturas, de pH., etc. etc.

El resto del equipo está compuesto de centrífugas de cesta para separación del sólido de productos precipitados, cristalizados, vitrificados o en acero inoxidable, tanques de precipitación con agitación variable y todos los elementos auxiliares y de control necesarios (figura 17).

Se dispone de molinos, homogeneizadores, filtros de esterilización por placas y columnas de vidrio para la extracción de productos por paso y elución de resinas cambiadoras de iones.

3.4.2. Metodos de extracción

Con los primeros caldos se realizaron muchas pruebas, unas se fueron abandonando por su poco rendimiento y otras por tener previsiblemente un gran coste al emplearse disolventes en gran cantidad. De entre los ensayos válidos se adoptó como primer proceso útil el que se expone a continuación :

Filtración :

Se filtra el caldo cosechado con un pH.entre 7,5 - 8,0.

Esta operación se lleva a cabo en un equipo de filtros de laboratorio, - filtro prensa o rotativos. En los dos últimos casos se trabaja con pre-capas y de modo continuo. El caldo filtrado alimenta la segunda fase de extracción.

Primera precipitación de la proteasa cruda .

Con el caldo filtrado y a temperaturas comprendidas entre los 20 y 30°C . se realiza un "salting-out", por adición de sulfatos sódico y amónico, que originan la precipitación de la proteasa. Esta se filtra y se recoge como producto crudo en el filtro prensa.

Acabada la filtración se fuerza el paso del filtrante, con vacío o con aire, para eliminar líquidos madres.

Disolución de la proteasa cruda y segunda precipitación:

La proteasa cruda así obtenida, se disuelve en tampón de fosfatos pH. 8,5, ya que a este pH. solamente se disuelve la parte activa. El tampón rico así formado, se clarifica por nueva filtración y de él por nuevo "salting-out", se precipita un enzima más purificado que se separa de los líquidos madres, mediante centrifugación o filtración.

Se suspende el producto obtenido en una mezcla de acetona-metanol, y se deseca en estufa de vacío o con corriente de aire - caliente.

El producto seco, que constituyen los llamados enzimas proteolíticos C.E.P.A., se muele, tamiza, homogeniza y se muestrea para determinar su actividad enzimática y demás especificaciones.

El producto obtenido con este proceso suele tener actividades Anson relativamente bajas, y los rendimientos no han superado el 40% en ningún caso.

Los ensayos realizados posteriormente, para mejorar la extracción se encaminaron en primer lugar a lograr caldos perfectamente bien filtrados para eliminar las proteínas que arrastran y en segundo lugar, conseguir proteasas mejor precipitadas que permitieran una filtración rápida en lugar de una centrifugación. Por otra parte se intentó obtener una proteasa cruda con actividad suficientemente alta, que permitiera su utilización directa en algunos casos con lo que se acortaría considerablemente el proceso de extracción.

La modificación introducida para lograr estos propósitos fué someter los caldos cosechados a una defecación previa mediante la adición de una solución concentrada de cloruro cálcico, seguida de una solución de fosfatos con la que se consiguió así la precipitación de fosfatos de calcio que coprecipitan las proteínas presentes. Estos caldos así tratados dan por filtración unos filtrados totalmente límpidos y brillantes. Al caldo filtrado se añade después sulfato sódico

co antes de proceder al primer "salting-out", con objeto de eliminar los restos de calcio añadido en la defecación. Con esta modificación se obtiene mejor rendimiento en filtración y precipitación y productos puros de más actividad.

A partir de este producto concentrado, se preparan los de menor concentración por dilución en lactosa. En este caso el enzima se diluye en un homogeneizador por mezcla con lactosa, hasta ajustar su actividad a 1.000 o 2.000 UA/mg. y se envasa el producto.

3.5. Medios de cultivo

3.5.1. Laboratorio

Medios de siembra

Medio QP. (sólido, placas de petri y frascos Roux)

| | | | |
|---------------------------|-------|------------|-----|
| Polvo de pezuña | | 40,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | | 1,5 | g. |
| Sulfato de magnesio | | 0,05 | g. |
| Cloruro cálcico | | 0,05 | g. |
| Sulfato ferroso | | 0,015 | g. |
| Sulfato de cinc | | 0,005 | g. |
| Bacto agar "Difco" | | 25,0 | g. |
| Agua destilada c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 8,3 - 8,4 | |
| Esterilización, 121º C. | | 30 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,2 - 7,4 | |

Medio CC (sólido, conservación de la cepa)

| | | |
|-----------------------------------|------------|-----|
| Bacto soytone "Difco" | 10,0 | g. |
| Extracto de carne | 5,0 | g. |
| Dextrosa | 5,0 | g. |
| Cloruro sódico | 5,0 | g. |
| Sulfato de cinc | 0,01 | g. |
| Bacto agar "Difco" | 20,0 | g. |
| Agua destilada c.s.p. | 1.000 | ml. |
| pH 6,0- ajustado con NaOH a | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121º C. | 30 minutos | |
| pH después de esterilizar | 7,0 - 7,2 | |

Medio A. (sólido, placas de aislamiento)

| | | |
|---------------------------------|------------|-----|
| Pasta de tomate | 20,0 | g. |
| Copos de avena | 20,0 | g. |
| Bacto agar "Difco" | 15,0 | g. |
| Agua destilada c.s.p. | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | 7,4 - 7,2 | |
| Esterilización, 121º C. | 30 minutos | |
| pH después de esterilizar | 7,0 - 7,2 | |

Medio UC-1 (matraces siembra y Frascos Florence)

| | | | |
|---------------------------|-------|------------|-----|
| Polvo de pezuña | | 10,0 | g. |
| N-Z. Amina | | 10,0 | g. |
| Extracto de carne | | 3,0 | g. |
| Dextrosa | | 10,0 | g. |
| Cloruro sódico | | 5,0 | g. |
| Agua destilada c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 8,3 - 8,4 | |
| Esterilización, 121º C. | | 15 minutos | |
| pH despues de esterilizar | | 7,0 - 7,2 | |

Medio UC-2 (Matraces siembra y Frascos Florence)

| | | | |
|--|-------|------------|-----|
| Bacto soytone "Difco" | | 10,0 | g. |
| Dextrosa | | 5,0 | g. |
| Cloruro sódico | .. | 5,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | | 5,0 | g. |
| Antiespumante, silicona | | 1,0 | ml. |
| Agua destilada c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH 5,7 - 5,8 ajustado con NaOH, 5N ... | | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121º C. | | 30 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,0 - 7,2 | |

Medio de fermentación

Medio Q. (Matraces producción)

Nickerson (11)

| | | | |
|---------------------------|-------|------------|-----|
| Polvo de pezuña | | 40,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | | 1,5 | g. |
| Sulfato de magnesio | | 0,05 | g. |
| Cloruro cálcico | | 0,05 | g. |
| Sulfato ferroso | | 0,015 | g. |
| Sulfato de cinc | | 0,005 | g. |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 8,3 - 8,4 | |
| Esterilización, 121° C | | 30 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,2 - 7,4 | |

3.5.2. Planta Semipiloto y Planta Piloto

Medios de siembra:

Medio QS. (Fracos Florence y Fermentadores de siembra.)

| | | | |
|---------------------------|-------|------------|-----|
| Harina de soja | | 20,0 | g. |
| Polvo de pezuña | | 20,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | | 1,5 | g. |
| Sulfato de magnesio | | 0,05 | g. |
| Cloruro cálcico | | 0,05 | g. |
| Sulfato ferroso | | 0,015 | g. |
| Sulfato de cinc | | 0,005 | g. |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 8,3 - 8,4 | |
| Esterilización, 121° C. | | 30 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,2 - 7,4 | |

Medio Q-SS-1 (Frascos Florence y Fermentadores de
siembra.)

| | | | |
|---------------------------|-------|------------|-----|
| Harina de soja | | 10,0 | g. |
| Polvo de pezuña | | 5,0 | g. |
| Dextrosa | | 5,0 | g. |
| Cloruro sódico | | 5,0 | g. |
| Fosfato monopotásico | | 5,0 | g. |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121º C. | | 20 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,0 - 7,2 | |

Medio Q-SS-2 (Frascos Florence y Fermentadores de
siembra)

| | | | |
|---------------------------|-------|------------|-----|
| Peptona de soja | | 10,0 | g. |
| Polvo de pezuña | | 5,0 | g. |
| Dextrosa | | 5,0 | g. |
| Cloruro sódico | | 5,0 | g. |
| Fosfato monopotásico | | 5,0 | g. |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121º C. | | 20 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,0 - 7,2 | |

Medio Q-SS-3

| | | | |
|---------------------------|-------|------------|-----|
| Harina de soja | | 30,0 | g. |
| Polvo de pezuña | | 5,0 | g. |
| Cloruro sódico | | 5,0 | g. |
| Fosfato monopotásico | | 5,0 | g. |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121º C. | | 30 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,0 - 7,2 | |

Medios de fermentación.

Medio Q.

Medio Q-S-1.

| | | | |
|---------------------------|-------|------------|-----|
| Harina de soja | | 20,0 | g. |
| Polvo de pezuña | | 10,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | | 1,5 | g. |
| Sulfato de magnesio | | 0,05 | g. |
| Cloruro cálcico | | 0,05 | g. |
| Sulfato ferroso | | 0,015 | g. |
| Sulfato de cinc | | 0,005 | g. |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 7,6 - 7,8 | |
| Esterilización, 121º C. | | 30 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,0 - 7,2 | |

Medio Q-S-2

| | | | |
|---------------------------|-------|------------|-----|
| Harina de soja | | 30,0 | g. |
| Polvo de pezuña | | 5,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | | 1,5 | g. |
| Sulfato de magnesio | | 0,05 | g. |
| Cloruro cálcico | | 0,05 | g. |
| Sulfato ferroso | | 0,015 | g. |
| Sulfato de cinc | | 0,005 | g. |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121º C. | | 30 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,0 - 7,2 | |

Medio Q-S-6

| | | | |
|---------------------------|-------|------------|-----|
| Harina de soja | | 30,0 | g. |
| Polvo de pezuña | | 5,0 | g. |
| Dextrosa | | 30,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | | 0,05 | g. |
| Sulfato de magnesio | | 0,05 | g. |
| Cloruro cálcico | | 0,015 | g. |
| Sulfato ferroso | | 0,005 | g. |
| Sulfato de cinc | | 1,5 | g. |
| Carbonato cálcico | | 10,0 | g. |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121º C. | | 20 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,0 - 7,2 | |

Medio 1

| | | |
|---------------------------------|------------|-----|
| Harina de soja | 10,0 | g. |
| Levadura de panadería | 5,0 | g. |
| Corn-Steep (líquido, 50%) | 30,0 | g. |
| Lactosa | 4,0 | g. |
| Sulfato de magnesio | 0,25 | g. |
| Cloruro sódico | 0,75 | g. |
| Fosfato bipotásico | 2,0 | g. |
| Almidón | 30,0 | g. |
| Agua c.s.p. | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121° C. | 20 minutos | |
| pH después de esterilizar | 7,0 - 7,2 | |

Medio 2

| | | |
|---------------------------------|------------|-----|
| Harina de soja | 35,0 | g. |
| Levadura de cerveza | 20,0 | g. |
| Corn-Steep (líquido, 50%) | 50,0 | g. |
| Sulfato de magnesio | 0,3 | g. |
| Cloruro sódico | 3,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | 1,5 | g. |
| Almidón | 30,0 | g. |
| Agua c.s.p. | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121° C. | 30 minutos | |
| pH después de esterilizar | 7,0 - 7,2 | |

Medio 3

| | | |
|---------------------------------|------------|-----|
| Harina de soja | 15,0 | g. |
| Levadura de panadería | 15,0 | g. |
| Lactosa | 35,0 | g. |
| Corn-Steep (líquido, 50%) | 100,0 | g. |
| Sulfato de magnesio | 0,4 | g. |
| Cloruro sódico | 2,5 | g. |
| Fosfato bipotásico | 1,5 | g. |
| Almidón | 30,0 | g. |
| Agua c.s.p. | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121° C | 20 minutos | |
| pH después de esterilizar | 7,0 - 7,2 | |

Medio 4

| | | |
|---------------------------------|------------|-----|
| Harina de soja | 15 0 | g. |
| Levadura de panadería | 15,0 | g. |
| Lactosa | 35,0 | g. |
| Corn-Steep (líquido, 50%) | 100,0 | g. |
| Sulfato de magnesio | 0,4 | g. |
| Cloruro sódico | 2,5 | g. |
| Fosfato bipotásico | 1,5 | g. |
| Almidón | 35,0 | g. |
| Agua c.s.p. | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121° C. | 20 minutos | |
| pH después de esterilizar | 7,0 - 7,2 | |

Medio 5

| | | |
|---------------------------------|------------|-----|
| Harina de soja | 35,0 | g. |
| Levadura de cerveza | 15,0 | g. |
| Lactosa | 15,0 | g. |
| Corn-Steep (líquido, 50%) | 100,0 | g. |
| Sulfato de magnesio | 0,4 | g. |
| Cloruro sódico | 2,5 | g. |
| Fosfato bipotásico | 15,0 | g. |
| Almidón | 30,0 | g. |
| Agua c.s.p. | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121º C. | 20 minutos | |
| pH después de esterilizar | 7,0 - 7,2 | |

Medio E/4

| | | |
|---|------------|-----|
| Harina de soja | 10,0 | g. |
| "Noredux . 150H" (almidón soluble) ... | 30,0 | g. |
| Corn-Steep sólido | 5,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | 1,0 | g. |
| Sulfato ferroso | 0,015 | g. |
| Sulfato magnésico | 0,05 | g. |
| Cloruro cálcico | 0,5 | g. |
| Carbonato cálcico | 10,0 | g. |
| Antiespumante | 1 ml. | g. |
| Agua c.s.p. | 1.000 | ml. |
| pH natural 6,5, ajustado con NaOH a ... | 7,6 - 7,8 | |
| Esterilización 121º C. | 30 minutos | |
| pH después de esterilizar | 7,2 - 7,4 | |

Medio SP/1

| | | | |
|----------------------------------|-------|------------|-----|
| Glucosa | | 30,0 | g. |
| Levadura Láctica | | 10,0 | g. |
| Carbonato cálcico | | 4,0 | g. |
| Cloruro cálcico | | 2,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | | 1,0 | g. |
| Antiespumante | | 1 ml. | |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH natural 6,0 ajustado con NaOH | | 7,6 - 7,8 | |
| Esterilización 121°C | | 20 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,0 - 7,2 | |

Medio QS-6/1

| | | | |
|--|-------|------------|-----|
| Harina de soja | | 30,0 | g. |
| Polvo de pezuña | | 5,0 | g. |
| Dextrosa | | 30,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | | 0,05 | g. |
| Sulfato de magnesio | | 0,05 | g. |
| Cloruro cálcico | | 0,015 | g. |
| Sulfato ferroso | | 0,005 | g. |
| Sulfato de zinc | | 1,5 | g. |
| Carbonato cálcico | | 10,0 | g. |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121°C | | 20 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,2 - 7,4 | |
| Adiciones durante la fermentación, de 10,0 g/l de Dextrosa y Harina de soja, a las 30 y 48 horas de proceso, para los fermentadores de 5 litros. | | | |

Medio QS-6/2

| | | | |
|---------------------------|-------|------------|-----|
| Harina de soja | | 30,0 | g. |
| Polvo de pezuña | | 5,0 | g. |
| Dextrosa | | 30,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | | 0,05 | g. |
| Sulfato de magnesio | | 0,05 | g. |
| Cloruro cálcico | | 0,015 | g. |
| Sulfato ferroso | | 0,005 | g. |
| Sulfato de zinc | | 1,5 | g. |
| Carbonato cálcico | | 10,0 | g. |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |
| pH antes de esterilizar | | 7,4 - 7,6 | |
| Esterilización, 121º C. | | 20 minutos | |
| pH después de esterilizar | | 7,2 - 7,4 | |

Adiciones durante la fermentación, de 10,0 g/l. de -
Dextrosa y "Proflo" a las 30 y 48 horas de proceso, pa-
ra los fermentadores de 5 litros.

Medio QS-6/3

| | | | |
|---------------------|-------|-------|-----|
| Harina de soja | | 30,0 | g. |
| Polvo de pezuña | | 5,0 | g. |
| Dextrosa | | 30,0 | g. |
| Fosfato bipotásico | | 0,05 | g. |
| Sulfato de magnesio | | 0,05 | g. |
| Cloruro cálcico | | 0,015 | g. |
| Sulfato ferroso | | 0,005 | g. |
| Sulfato de zinc | | 1,5 | g. |
| Carbonato cálcico | | 10,0 | g. |
| Agua c.s.p. | | 1.000 | ml. |

| | |
|--------------------------------|------------|
| pH antes de esterilizar | 7,4 - 7,6 |
| Esterilización, 121º C. | 20 minutos |
| pH después de esterilizar..... | 7,2 - 7,4 |

Adiciones de 5,0 g/l. de polvo de pezuña y 5,0 g/l de Harina de soja y 10,0 g/l. de Dextrosa, a las 30, y - 48 horas de proceso, para los fermentadores de 5 litros.

Otros medios.

Además de las pruebas con los medios reseñados, se hicieron nuevas composiciones o variaciones de estos medios. La más utilizada fué la sustitución de la harina de soja en la carga inicial ó - en las sucesivas adiciones, por el "Proflo", (Harina de semilla de algodón).

En otras series de pruebas se ensayaron tanto en la carga inicial como en las adiciones, diferentes fuentes de hidratos - de carbono y proteínas en un gran rango de concentraciones.

Estas pruebas cuyo objeto era determinar el mejor medio de cultivo para estas fermentaciones, tuvieron en la mayoría de los casos poco éxito. Entre estas se eligieron, y se fueron adoptando como testigos sucesivos, las que realmente aportaron mejoras al -

- 108 -

proceso por su simplicidad, su mejor coste, mejor aprovisionamiento y sobre todo por dar las mayores actividades.

3.6. Métodos de valoración

A continuación se detallan los métodos de valoración y determinación de datos, empleados en este trabajo.

Algunos de ellos, como el de determinación de la actividad queratinolítica, "método de pezuña" y los de determinación de azúcar en los caldos de fermentación y peso seco de micelio, pertenecen a la rutina interna de trabajo, de la Compañía Española de la Penicilina y Antibióticos, y se han adecuado para estas determinaciones.

3.6.1 Patrones y sustancias de referencia.

A continuación se citan algunos de los patrones o productos de referencia que se han utilizado en las diferentes pruebas de puesta a punto de métodos y comprobaciones de productos obtenidos por nosotros.

- Hemoglobina bovina, tipo II. "Sigma Chemical Company", San Luis-Missouri. U.S.A.
- Urea, R.A. - Mallinckrodt. Art. 8648.
- L-Tirosina.- B.D.H.
- Patrones internos (C.E.P.A., enzima proteolítico.- Lotes, 9, (32 UQ.mg.) y QA 5/5, (50 UQ.mg.).
- Papaina 2 x. Cristalizada. "Sigma Chemical Company".
- Papaina cruda, tipo II.- "Sigma Chemical Company".
- Proteasa, tipo III.- "Sigma Chemical Company".

- 111 -

- Proteasa, tipo VI, repurificada, con 3-4 U.A. actividad.
"Sigma Chemical Company".
- Keratina - polvo.- "Nutricional Biochemicals. Cleve -
land". Ohio. U.S.A.



BIBLIOTECA

3.6.2. Determinación de la actividad queratinolítica.

Método de "pezuña" C.E.P.A., (44)

Fundamento. - Los enzimas queratinolíticos son capaces de digerir un sustrato queratinoso después de una incubación conveniente.

Se ha visto que, en determinadas condiciones experimentales y dentro de cierto límites, el consumo de sustrato guarda una relación lineal con el logaritmo de la concentración de enzima. - Por tanto es posible hacer cada día una curva patrón utilizando un enzima de actividad conocida y leer en ella la actividad de los problemas.

Material. -

- Viales de unos 10 ml. (tipo antibióticos), con tapones de goma.
- Tubos de centrífuga especiales de una capacidad total de 8 ml., provistos en un extremo de un vástago

cilíndrico aforado a 1 ml. con 50 divisiones de 0,02 ml. (figura 18).

- Mesa de agitación horizontal circular de 220 r.p.m. con un desplazamiento excéntrico de 5 cm. de diámetro instalada en un cuarto a 37° C. (figura 3).
- Tubos de ensayo. Pipetas de diferentes capacidades.

Reactivos:

- Enzima queratinolítico patrón. Es necesario establecer como patrón un enzima queratinolítico conocido para hacer la curva. En nuestro caso se empleó uno de 32 unidades queratinolíticas (UQ.) por mg. (lote 9). Patrón interno C.E.P.A.
- Sustrato queratinoso. Está constituido por polvo de -
pezuña de bóvidos, obtenido por molienda de pezuñas, previamente desecadas bajo lámpara de infrarrojo y pasado por tamiz entre 200 y 325 A.S.A. Cada lote de sustrato varia las condiciones experimentales del ensayo, por lo que, a cada cambio de lote, debe reajustarse el peso del sustrato usado en las pruebas.

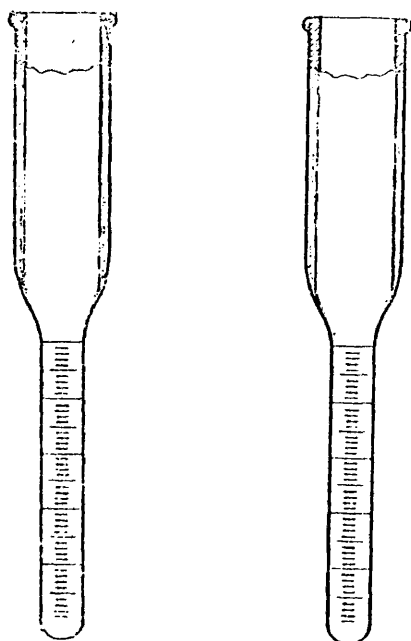


Figura 18

- Solución tampón de pH 8,5. Se usa para los ensayos en blanco y las soluciones de los enzimas. Su composición es:

| | | |
|--|-----------|-----------|
| PO_4HK_2 | | 10,0 g. |
| $\text{SO}_4\text{Hg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | | 0,05g. |
| Cl_2Ca | | 0,05g. |
| Mertiolato sódico (x) | | 0,05g. |
| Agua hasta | | 1.000 ml. |

Si es necesario, ajustar el pH a 8,5.

- (x) Se puede prescindir de añadir el mertiolato sódico (agente conservador) cuando la solución tampón - se usa en unos pocos días después de su preparación y se conserva en nevera.

Curva patrón.-

En cada serie de ensayos es necesario incluir una curva patrón de calibración, hecha con cuatro concentraciones del enzima patrón, frente al sustrato en uso.

Con el enzima patrón (32 UQ/mg.) se preparan las siguientes soluciones: Se pesan 4 g. de enzima y se añaden 50 ml. de - solución tampón de pH 8,5, agitando durante 15 minutos. Se filtra o -

centrífuga para obtener una solución transparente. Esta solución contiene 80 mg. de enzimas por ml. A partir de ella, y por diluciones sucesivas se obtienen las soluciones a 40, 20 y 10 mg/ml.

Estas diluciones son las empleadas en el ensayo que-
ratinolítico. Con los consumos de sustratos obtenidos con ellas, se -
construye una curva, llevándolos a la escala aritmética de un papel -
semilogarítmico frente a las concentraciones respectivas. Por lo ge-
neral con los cuatro puntos se puede ajustar gráficamente una línea -
recta. A veces, el punto correspondiente a la concentración de 10 -
mg/ml. queda por debajo de la recta en que se alinean los otros tres
puntos.

Sobre esta recta se hacen las lecturas de los proble-
mas.

Preparación de las muestras problemas.

Las muestras líquidas (caldo de fermentación, con--
centrados, etc.) se usan en el ensayo tal como son, o conveniente--
mente diluidas en la solución tampon de pH 8,5, pero en todo caso -
deben ser lo más transparentes posibles, filtrándolas o centrifugán-
dolas si fuese necesario.

Las muestras sólidas se disuelven asimismo en la so-

lución tampon, filtrándolas también o centrifugándolas para obtener -
soluciones transparentes. Hay que hacerlo así, porque los enzimas -
sólidos llevan ordinariamente un excipiente inerte e insoluble.

Para que los resultados del ensayo sean válidos, las
diluciones usadas deben ajustarse para dar un consumo de sustrato -
comprendido dentro de la recta patrón.

Ensayo queratinolítico

- Preparación de las mezclas enzimas-sustrato y blan-
cos:

Los ensayos se hacen siempre por duplicado, tanto pa-
ra las muestras problemas, como para la curva patrón
y blancos.

A cada vial de 10 ml. se pasan exactamente 300 mg.
(\pm 1 mg.) del sustrato, y se añaden después 5 ml. de
las soluciones de enzimas. Se tapan los viales y se -
agitan hasta . mojar bien todo el sustrato y suspen--
derlo en la solución, Los tapones de goma se sujetan
a los viales con cinta adhesiva. Se preparan siempre
2 ó 3 blancos con la misma cantidad de enzima y 5 ml.
de solución tampon de pH 8,5.

- Incubación: Todos los viales de la curva patrón, problemas y blancos se colocan en la mesa de agitación y se incuban a 37°C., durante 16 horas.
- Centrifugación: Al final del periodo de incubación, se vierte cuidadosamente el contenido de cada vial en el tubo de centrifuga especial, recogiendo las ultimas porciones con una cantidad de agua menor de 3 ml. y teniendo cuidado de que no queden residuos de sustrato adheridos a las paredes del vial.

Todos los tubos se centrifugan 5 minutos a 2.000 r.p.m. procediéndose después a la lectura de los resultados. El resultado de esta centrifugación suele dar en los blancos una lectura de 1 ml (\pm 0,02 ml.). Si no ocurre así habrá que ajustar las condiciones del centrifugado en cuanto al tiempo y velocidad, para obtener este resultado.

Lectura de resultados y cálculos:

- Lectura: Después de la centrifugación se hace la lectura volumétrica cuantitativa del sustrato no digerido, sobre el vástago cilíndrico de los tubos de centrifuga.

La diferencia de esta lectura con la del blanco, representa el sustrato digerido y esta diferencia queda ya expresada en porcentaje. Como se ha dicho, la lectura de los blancos debe ser de 1 ml. (\pm 0,02 ml.).

Las lecturas de los duplicados de la curva patrón y de los desconocidos no se deben diferenciar entre sí, más de 0,02 ml.. La lectura final para cada ensayo es el valor promedio de la de los duplicados.

- Cálculo de la potencia en unidades de los desconocidos:
Las lecturas de consumo de los problemas se llevan sobre la curva patrón, averiguando su equivalencia en mg/ml. del enzima patrón.

La actividad en unidades se obtiene con las siguientes fórmulas:

- Muestras de líquidos (caldos, concentrados, etc.)
$$\text{Mg/ml. equivalentes de la curva patrón} \times \text{riqueza en UQ. del patrón} \times \text{factor de dilución} = \text{Unidades/ml.}$$
- Productos sólidos:

Mg/ml. equivalentes de la curva patrón x riqueza en UQ.
del patrón.

Mg/ml. de la dilución problema

= Unidades/mg.

Observaciones:

Como se ha dicho en la preparación de las muestras problemas, las diluciones de los problemas deben estar ajustadas - de forma que las lecturas de consumo de sustrato caigan dentro de la recta patrón.

Se obtienen resultados más exactos ensayando las - muestras a 2 ó 3 diluciones y promediando después sus resultados individuales.

La unidad queratinolítica (UQ) se ha establecido de la siguiente forma:

Se ha convenido que un caldo, o una solución de enzima, tiene 1.000 u/ml., (UQ), cuando 5 ml. de la solución consumen un 30% de sustrato en las condiciones fijadas por el método, a saber:

Uso de la solución tampon de pH 8,5; 300 mg. de sus

trato por víal; incubación en agitación a 37°C. durante 16 horas; y centrifugación ajustada para dar una lectura final de 1 ml. (\pm 0,2 ml.) en los blancos.

En estas condiciones experimentales los consumos de sustrato que van del 10 al 45%, son proporcionales al logaritmo de la concentración del enzima.

3.6.3. Determinación de la actividad hemoglobino -
lítica.

Método Anson, (45)

En el método de la valoración de proteasas con hemoglobina, ésta se desnaturaliza y se digiere bajo condiciones estándar, el resto de la hemoglobina no digerida se precipita con ácido tricloroacético, y la cantidad de proteína no precipitada contiene los productos, que son una medida de cantidad de proteasa presente y se ponen de manifiesto con el reactivo de fenol, que da un color azul con tirosina y con triptófano.

La hemoglobina, a diferencia de la caseína y la gelatina, es un sustrato reproducible de tal forma que diferentes lotes de hemoglobina se digieren en la misma proporción en una solución dada de proteasa. No se debe olvidar que hay peptidasas además de proteasas, sin embargo la formación de productos no precipitables por el ácido tricloroacético se debe únicamente a la proteasa.

El método de la hemoglobina se ha descrito para la pepsina, Anson y Mirsky, (1932), (46), tripsina, Anson y Mirsky, (1933), (47), papaína, Anson, (1937a), (48), y catépsina Anson ,

(1937b), (49).

A continuación pasamos a describir el Método Anson:

1.- Reactivos:

Acido tricloroacético al 5% en agua (ATA 5%)

Solución de tirosina patrón en ATA al 5%.

Fosfato monopotásico 1 M.

Tampon i, 1M.de fosfato de pH - 7,5.

Hemoglobina desnaturalizada.

2.- Preparación de ácido tricloroacético al 5%:

Pesar en granatario, 55 gramos de ácido tricloroacético grado reactivo MERCK, Disolver y enrasar con agua a - 1.000 ml. en matraz aforado.

3.- Valoración del ácido tricloroacético al 5%:

Pipetear exactamente 10 ml. del ATA al 5% en un vaso de 250 ml. Añadir 2 gotas de fenolftaleína. Valorar hasta el rosa con NaOH 0,5 N de factor conocido. Deben gastarse 6,7 ml. de NaOH 0,5 N como máximo.

4.- Curva de patrón de Tirosina:

A) Solución inicial:

Disolver 100 mg. de tirosina exactamente pesados en

ácido tricloroacético al 5% y enrasar a 100 ml. en matraz aforado con este ácido. Esta solución tiene 1.000 mcg. de tirosina por ml.

B) Soluciones patrón:

Pipetear exactamente 6, 9, 12 y 15 ml. respectivamente en matraces aforados de 100 ml.

Enrasar cada matraz con ATA al 5%.

Estas soluciones tienen 60, 90, 120 y 150 mcg. de tirosina por ml.

C) Leer las absorciones de cada una de las soluciones a 280 mμ., usando el ATA al 5% como blanco de referencia.

D) Construir la curva patrón de tirosina en papel milimetrado, poniendo en ordenadas las absorciones y en abscisas los mcg. de tirosina por ml.

5.- Fosfato monopotásico 1 M:

Pesar exactamente 136,09 gr. de fosfato monopotásico. Disolver en 200 ml. de agua y pasar cuantitativamente a un matraz aforado de 1 litro. Enrasar a volumen con agua. El

pH de esta solución debe estar entre 4,3 a 4,7.

6.- Tampon 0,1 M de fosfatos de pH - 7,5

- A) Pesar exactamente 16,73 g. de fosfato bipotásico en un vaso de 250 ml. Disolver en 200 ml. de agua y - pasar a un vaso de 1 litro.
- B) Pesar exactamente 0,523 g. de fosfato monopotásico en un vaso pequeño. Disolver en 200 ml. de agua y - añadir al vaso de 1 litro anterior.
Mezclar bien.
- C) Ajustar el pH hasta 7,5 con ácido fosfórico reactivo (al 85%). Son necesarias unas 20 gotas de este ácido.
- D) Pasar todo a un matraz aforado de 1 litro y enrasar a volumen con agua.

7.- Hemoglobina empleada:

Hemoglobina bovina marca "Sigma", de la "Sigma Chemical Company", San Luis, Missouri, USA, con thymerosal ya adicionado, como conservador.

8.- Sustrato de Hemoglobina desnaturalizada:

- A) Pesar exactamente 2,2 g. de hemoglobina y 36 g. de -

urea (MERCK). A un vaso de 250 ml. pasar aproximadamente unos 15 g. de urea, ya pesado anteriormente, y después la hemoglobina; mezclar bien y luego añadir la urea restante. Añadir unos 50 ml. de agua y agitar hasta su disolución, pasándose a un matraz volumétrico de 100 ml. Dejar esta solución a la temperatura ambiente.

- B) Añadir 8 ml. de NaOH 1 N, y después llevar al volumen de 100 ml. con agua destilada.
- C) Pasar a un matraz Erlenmeyer con tapón esmerilado y dejar la solución en reposo unos 30-45 minutos para su desnaturalización.
- D) Pasado este tiempo agregar 10 ml. de fosfato monopotásico 1 M y 4 g. de urea. Agitar hasta la completa disolución.
- E) Conservar la solución sustrato no más de 10 días en nevera o temperatura inferior a 5° C.

9.- Muestras :

Las muestras de fermentación se filtran con supercel para obtener caldos transparentes. Las diluciones se hacen con

buffer de fosfatos 0,1 M. Las muestras sólidas se disuelven con tampon de fosfatos 0,1 N y se agitan en un agitador magnético por espacio de 15 minutos. Se filtra.

Las diluciones apropiadas son aquellas que dan una densidad óptica comprendida entre 0,150 á 0,300 $m\mu$.

10.- Procedimiento

- 1.- Preparar tubos Nessler graduados a 25 ml.
- 2.- Añadir a uno de ellos 5 ml. de sustrato, medidos exactamente y colocar en un baño termorregulado a 25° (\pm 0,2° C.)
- 3.- Añadir 1 ml. de la solución problema (aprox. unas 2.000 u.), enrasar hasta 25 ml. con H₂O destilada, a 25° C. Agitar.
- 4.- El período de incubación es de exactamente 10 minutos, a partir del enrase de la solución.
- 5.- Transcurridos los 10 minutos de incubación verter la solución sobre 10 ml. de ácido tricloroacético al 5%.
- 6.- Dejar en reposo la solución durante 30 minutos. Pasado este tiempo, filtrar y leer después a 280 $m\mu$ frente a un blanco, cuya preparación es la siguiente :

Blanco :

1. En un tubo Nessler añadir 5 ml. de sustrato exactamente medido y colocar en el baño termorregulado a 25^o (\pm 0,2^o C.)
2. Añadir 10 ml. de ácido tricloroacético al 5% que estará también a 25^o. Agitar.
- 3.- Añadir 1 ml. de solución problema. Agitar. Se enrasa a 25 ml. con agua destilada a 25^o C.
- 4.- Período de incubación de 10 minutos exactamente, a partir del momento que se enrasó la solución.
- 5.- Transcurridos los 10 minutos de incubación, se vierte la solución sobre 10 ml. de agua destilada.
- 6.- Dejar en reposo la solución durante 30 minutos.
- 7.- Pasado este tiempo, se procede a filtrar.

11.- Valoración :

Para la valoración, Anson utiliza la colorimetría emplean -

do como reactivo, fenol, preparado de acuerdo con Folin y Ceocalteau (1927), (50).

Nosotros hemos empleado el método espectrofotométrico haciendo la lectura en un espectrofotómetro BECKMAN DU a una longitud de onda de 280 μ m.

12.- Cálculos :

Productos sólidos :

La densidad óptica obtenida se lleva a la recta de calibración de tirosina para hallar los mcg. de tirosina liberados.

$$\frac{\text{mcg. Tirosina liberados} \times 35}{\text{mg. muestra por ml.}} = \text{Unidades Anson a } 25^{\circ}\text{C/mg.}$$

Muestras de líquidos :

mcg. Tirosina liberados \times 35 \times dilución = Unidades Anson a 25° C/ml.

"Nosotros definimos como unidad Anson (U.A.) la cantidad de enzima que, incubada durante 10 minutos a 25° C. (\pm 0,2) con la hemoglobina previamente desnaturalizada, libera de este sustrato 1 mcg. de Tirosina".

3.6.4. Comparación entre los dos métodos

Al producirse el paso a la fábrica, y variar por tanto las condiciones de trabajo hubo que considerar desde distinto punto de vista los resultados de la valoración de la proteasa según el Método Anson o el Método de "pezuña" anteriormente descrito. Se llegó a la conclusión de que era más provechoso sustituir el método de "pezuña" por el de Anson, porque el análisis de una muestra se realizaba en el plazo de 3 horas, con una reproductibilidad aproximada de $\pm 0,5\%$ mientras que con el método de "pezuña" se necesitan unas 19 horas y una precisión aproximada al $\pm 19,0\%$.

El cambio de método supuso una mayor comodidad de cálculo para la determinación de unidades, cuyos factores de equivalencia experimentales, se expresan a continuación :

| | | |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| En caldo cosechado | 1 unidad pezuña | = 1,88 U. Anson |
| En caldo filtrado | 1 " " | = 2,20 U. " |
| En enzima crudo | 1 " " | = 2,63 U. " |
| En enzima puro de unas 2000 U.A. | 1 " " | = 3,13 U. " |

No se conoce la causa de la diferencia de factores en las distintas fases de proceso.

Los rendimientos promedios de los procesos, expresados en ambas unidades son:

| | <u>Unidades</u> | | Factor de transformación en unidades |
|---|-----------------|--------------|--------------------------------------|
| | <u>Pezuña</u> | <u>Anson</u> | <u>Anson.</u> |
| Caldo cosechado/caldo filtrado | 58,6% | 74,1% | 1,27 |
| Caldo cosechado/enzima crudo | 33,9% | 51,1% | 1,55 |
| Enzima crudo/enzima puro (2000 U.A.) | - | 55,8% | - |

Se ha estimado como más conveniente expresar todos los resultados en unidades Anson ya que hasta el momento, no se ha encontrado ninguna razón experimental en contra.

A pesar de los razonamientos anteriores, no se debe olvidar que el método Anson no es específico para la proteasa CEPA y que además, como la estimación cuantitativa depende de la velocidad de reacción para degradar la hemoglobina a tirosina, conviene tener en cuenta que pequeñas variaciones en la técnica operatoria o de algunos imponderables en los medios de reacción, pueden alterar los resultados, por lo que es aconsejable que, en casos de duda, se disponga del método de "pezuña" para aclarar cualquier resultado que se considere anormal.

3.6.5 Método de determinación de azúcar (51)

Sacarosa

Reactivos :

Acetato de plomo 20%

Sulfato sódico 20%

Acido clorhídrico 1,2 N.

Hidróxido sódico 1,2 N.

Acido pícrico 0,5%

Carbonato sódico 20%.

Preparación de la Curva :

Pesar 4 gramos de sacarosa y disolver en 1.000 ml.
de agua destilada.

De esta dilución poner en matraces de 50 ml.:

- 133 -

10 ml. en el 1º

20 ml. en el 2º

30 ml. en el 3º

40 ml. en el 4º

50 ml. en el 5º

Enrasar con agua destilada y mezclar

De cada matraz se cogen 25 ml. para la defecación y se sigue la rutina.

Defecación; hidrólisis; reacción color.

Coger 3 ml. de cada tubo y echar en un matraz de 25 ml. Enrasar con agua destilada y mezclar. Leer en el espectrofotómetro BECKMAN B, a 455 mμ.

En papel milimetrado representar las lecturas sabiendo que a la dilución 10/50 corresponden 0,08 gramos % sacarosa.

| | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|---|---|
| " | 20/50 | " | 0,160 | " | " | " |
| " | 30/50 | " | 0,240 | " | " | " |
| " | 40/50 | " | 0,320 | " | " | " |
| " | 50/50 | " | 0,400 | " | " | " |

Procedimiento :

Primeramente filtrar el caldo de fermentación. Defecar:

- 134 -

25 ml. de caldo filtrado

5 ml. de acetato de plomo 20%

5 ml. de sulfato sódico 20%

Agitar y filtrar, hidrólisis:

1 ml. de caldo defecado y filtrado

2 ml. de ácido clorhídrico 1,2 N

Llevar al baño de agua hirviente 30 minutos. Enfriar con agua corriente. Añadir 2 ml. de hidróxido sódico 1,2 N.

Reacción de color:

| | | |
|--------|---|-------------------------------|
| | (| 3 ml. de agua destilada |
| | (| |
| Blanco |) | 3 " " ácido pícrico 0,5% |
| | (| |
| | (| 3 " " carbonato sódico 20% |
| | (| |
| | (| 3 ml. de solución hidrolizada |
| | (| |
| Mues- |) | 3 " " ácido pícrico 0,5% |
| tra. | (| |
| | (| 3 " " carbonato sódico 20% |

Llevar los dos tubos al baño de agua hirviente 15 minutos. Enfriar. Pipetear de cada tubo 3 ml. a un matraz de 25 ml. - enrasar con agua destilada y mezclar. Leer la muestra frente al blanco en el espectrofotómetro BECKMAN B, a 455 mμ

Llevar la lectura a la curva. Se obtiene % de sacarosa.

Glucosa

Procedimiento:

Filtrar el caldo de fermentación. Defecar:

25 ml. de caldo filtrado

5 ml. de acetato de plomo 20%

5 ml. de sulfato sódico 20%

Reacción de color:

| | | | |
|----------|--------------------------|---------------------------------|--|
| | (| 3 ml. de agua destilada | |
| | (| | |
| Blanco |) | 3 " " ácido pícrico 0,5% | |
| | (| | |
| | (| 3 " " carbonato sódico 20% | |
| | (| | |
| | (| 3 " " caldo defecado y filtrado | |
| | (| | |
| Muestra) | 3 " " ácido pícrico 0,5% | | |
| | (| | |
| | (| 3 " " carbonato sódico 20% | |

Poner en baño de agua hirviente durante 15 minutos.

Pasados 15 minutos sacar del baño y enfriar en agua corriente. Una

vez frío y en matraz hacer la dilución según la concentración. Para:

| | | | | |
|---------------|----------------|-------|--------------|---------|
| concentración | 0,04% - 0,08%. | 3 ml. | en matraz de | 10 ml. |
| " | 0,05% - 0,20%. | 3 " | " " " | 25 ml. |
| " | 0,10% - 0,40%. | 3 " | " " " | 50 ml. |
| " | 0,20% - 0,80%. | 3 " | " " " | 100 ml. |

Leer en el espectrofotómetro BECKMAN B, a 455 mμ.
frente al blanco, con igual dilución que la muestra.

Cálculos:

| | | | | | | |
|---------------|----------|---------|---|-------|---|----------|
| Para dilución | 3/10. | Lectura | x | 0,094 | = | gramos % |
| " | " 3/25. | " | x | 0,195 | = | " " |
| " | " 3/50. | " | x | 0,356 | = | " " |
| " | " 3/100. | " | x | 0,680 | = | " " |

3.6.6. Método de determinación del pH.

Para la medida del pH. en todas las determinaciones necesarias, se han utilizado pH.-metros de precisión como los BECK-MAN modelos G. y H.

Estos aparatos tenían electrodos de vidrio y calomelanos, con un rango de medida de pH. de 0,00 - 14,00 (\pm 0,01).

No se detallan, ni se expone su funcionamiento, por ser de sobra conocido su manejo y exactitud de medida.

3.6.7. Método de determinación del peso seco del
Micelio

Método C.E.P.A. (52)

Procedimiento :

Tarar el papel de filtro. Filtrar por duplicado en un embudo Buchner 50 ml. de caldo (bien agitado). Lavar la torta con 50 ml. de agua destilada acidulada con 1,5 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Lavar después con 50 ml. de agua destilada.

Recoger la torta lo más seca posible y ponerla en una cápsula llevándola a la estufa a 100° C. Sacarla 5 ó 6 horas después y ponerla a enfriar en un desecador. Pesar en balanza de precisión.

Cálculos:

Se resta la tara del peso de cada duplicado, se halla la media y el valor obtenido de ésta, se multiplica por 2, quedando expresado el peso seco de micelio en % (mg/ml). Peso micelio por volumen. (P.M.V.)

3.6.8. Método estadístico .

Estudio estadístico de los resultados (53).

Con los resultados obtenidos en las experiencias de fermentación, se hizo un estudio estadístico, tratando de determinar valores fundamentales tales como valor medio, límite superior e inferior del valor medio, desviación de la media y el índice de variabilidad.

Se ha trabajado con los valores de la "t de Student", significativos entre dos muestras medias, para un límite de confianza del 95% y en función de los grados de libertad $n-1$, siendo n , el número de determinaciones efectuadas.

Se resumen los signos convencionales empleados en las tablas de resultados de datos estadísticos, como interpretación de los mismos.

n .- Número de muestras

\bar{x} .- Media

$\bar{x} + tds$.- Límite superior de la media

$\bar{x} - tds$.- Límite inferior de la media

$ds\bar{x}$.-Desviación de la media

IV.%. - Índice de variabilidad en tanto por ciento.

4. RESULTADOS

Se han agrupado según el orden de las mismas los resultados de las pruebas y experiencias realizadas. Se señalan en cada prueba las variables introducidas de acuerdo con los datos que se iban obteniendo.

Se comentan los resultados y se exponen en forma gráfica y estadística, para la ponderación de los datos y su valoración en la investigación realizada.

112

FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN MATRACES.

Pruebas con medio Q. (Testigo).

Se ha tomado como punto de partida una modificación del medio de Nickerson, (11), al que denominamos Medio Q. y que empleamos como Testigo. La modificación consiste en utilizar pezuña molida al 4% como material proteico y aumentar las cantidades de algunas sales.

En la curva 1, promedio de 12 pruebas de fermentaciones en matraces, se puede observar la evolución de la actividad queratinolítica en UQ/ml, del pH y del consumo de azúcar durante la fermentación con el medio Q.

La primera valoración de la actividad queratinolítica se hizo a las 24 horas del proceso, con el valor promedio de 485 UQ/ml.

En las siguientes valoraciones, efectuadas a las 24, 36, 48, 60, 80 y 96 horas se aprecia un aumento en los valores obtenidos, que al final de la fermentación, llega a 1.163 UQ/ml.

Se hicieron también determinaciones del consumo de - azúcar durante el proceso. Al comienzo, 0 horas, dió 26,0 mg/ml. - de azúcar (para 30,0 mg/ml. en el medio), dicha cantidad fue disminuyendo hasta valores inapreciables a las 96 horas de fermentación. - Es decir, a lo largo del proceso se consumió todo el azúcar.

La evolución del pH, aproximadamente 7,0 al comienzo de la fermentación, tiene una bajada a las 12 horas de proceso llegando a valores próximos a 6,0. A partir de este momento se inicia una subida y a las 48 horas se sitúa en valores de 8,0 que se mantiene, o se elevan hasta el final del proceso.

En la tabla 1, se incluyen los datos estadísticos de las 12 pruebas de fermentación realizadas en matraces.

11h

UQ/ml

3500

3000

2500

2000

PH

9

8

7

6

5

AZUCAR mg/ml

30

20

10

0

HORAS

24

48

72

84

CURVA 1

Fermentación de enzimas proteolíticos en matraces.

Medio Q.

Actividades queratinolíticas.

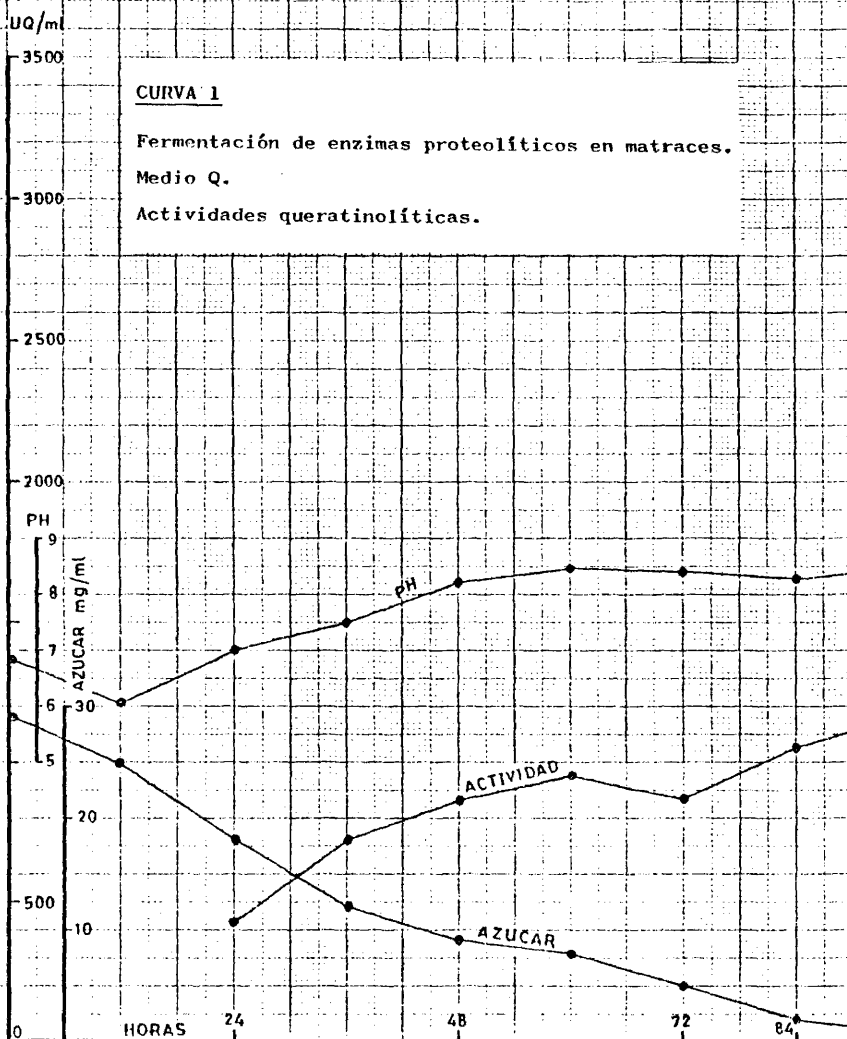


TABLA 1

Fermentación de enzimas proteolíticos en matraces.

Medio Q.

Actividades queratinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|--------------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| Fermentación Matraces | 12 | 902 | 1.163 | 1.424 | 118 | 35 |

146

FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN
PLANTA SEMIPILOTO.

Pruebas con medio Q. (Testigo)

Siguiendo las condiciones standard de trabajo para los fermentadores de 8 litros, se comenzaron las pruebas comprobándose antes los inóculos, medios y demás condiciones del proceso.

En la curva 2, promedio de 20 pruebas de fermentación en Planta Semipiloto para la puesta a punto del proceso, se puede seguir el curso de la misma empleando el medio Q., que al igual que en el laboratorio, tomamos como testigo.

Las valoraciones realizadas sobre la actividad queratinolítica, UQ/ml. ponen de manifiesto un aumento progresivo a lo largo de todo el proceso, con un valor máximo de 1.540 UQ/ml., a las 72 horas. A partir de este valor, se manifiesta una disminución quizás debida a la poca estabilidad del enzima a los altos pH alcanzados.

El medio Q., tenía un pH inicial de 7,2-7,3 después de esterilizar. A las 12 horas el pH del caldo de fermentación era ligeramente más bajo. En las siguientes medidas realizadas a las 24, 36, - 48 y 60 horas, se observó un incremento del mismo, para alcanzar al final del proceso, a las 72 horas, un valor de 8,5.

En cuanto al contenido de azúcar en el medio, se observa un rápido descenso durante las 24 primeras horas, habiéndose consumido prácticamente todo el azúcar a las 36 horas del proceso de fermentación.

En la tabla 2, se exponen los datos estadísticos de estas pruebas.

148

UQ/ml

3500

3000

2500

2000

1500

1000

500

0

PH

9

8

7

6

5

4

3

2

1

0

AZÚCAR mg/ml

30

20

10

0

HORAS

0

24

48

72

CURVA 2

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Medio Q.

Actividades queratinolíticas.

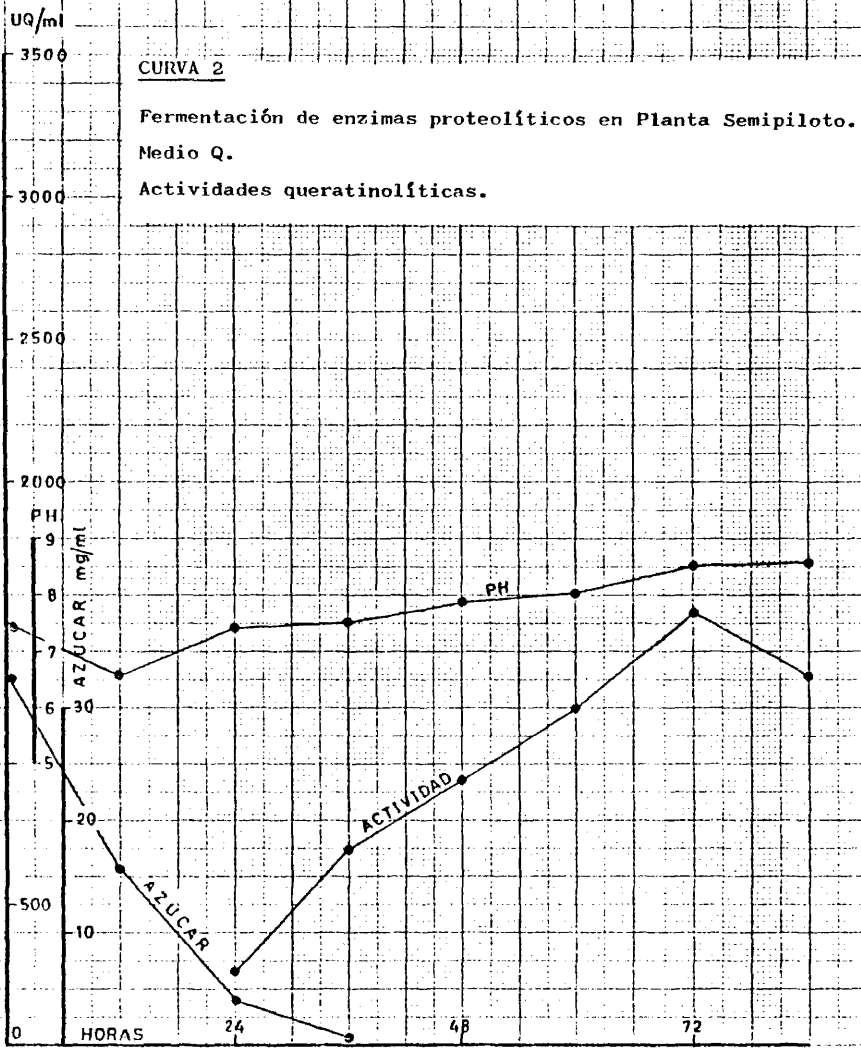


TABLA 2

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Medio Q.

Actividades queratinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | \bar{dsx} | I.V. % |
|-------------------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| Fermentación P. Semipiloto | 20 | 1.443 | 1.540 | 1.636 | 46 | 13 |

150

FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN PLAN-
TA SEMIPILOTO.

Selección de medios de cultivo.

Medios, Q, (Testigo), QS, QS-1, QS-2 y QS-6

En la Planta Semipiloto se ensayaron numerosos medios de cultivo para seleccionar el más apropiado.

Las condiciones en que se realizaron estos procesos - fueron las de rutina para estos fermentadores; 28° C de temperatura; una aireación de 0,5 litros por litro de medio de cultivo, por minuto y 600 r.p.m. de agitación.

A lo largo de todo el proceso se hicieron valoraciones de las actividades cada doce horas a partir de las 36, observándose que las máximas se obtenían entre las 72-96 horas, como se puede ver en la curva 3, que representa la evolución de las actividades a lo largo del proceso.

El medio Q. se modificó en su composición inicial componiendo los medios QS; QS-1; QS-2 y QS-6, con los que se alcanzaron actividades cuyos valores promedio, se exponen en la tabla 3.

En la gráfica 3, se representan las actividades promedio y márgenes de confianza de los cinco grupos de fermentación ensayados. Como puede verse no existen grandes diferencias entre las actividades promedio obtenidas con los diferentes medios de cultivo.

No obstante, como con el medio QS-6 se obtuvieron las actividades mayores, se determinó adoptar, hasta nuevas experiencias, este medio de cultivo.

UQ/ml
3500CURVA 3

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de cultivo.

Medios Q. (Testigo); QS; QS-1; QS-2 y QS-6.

Actividades Queratinolíticas.

2500

2000

1500

1000

500

HORAS

24

48

72

84

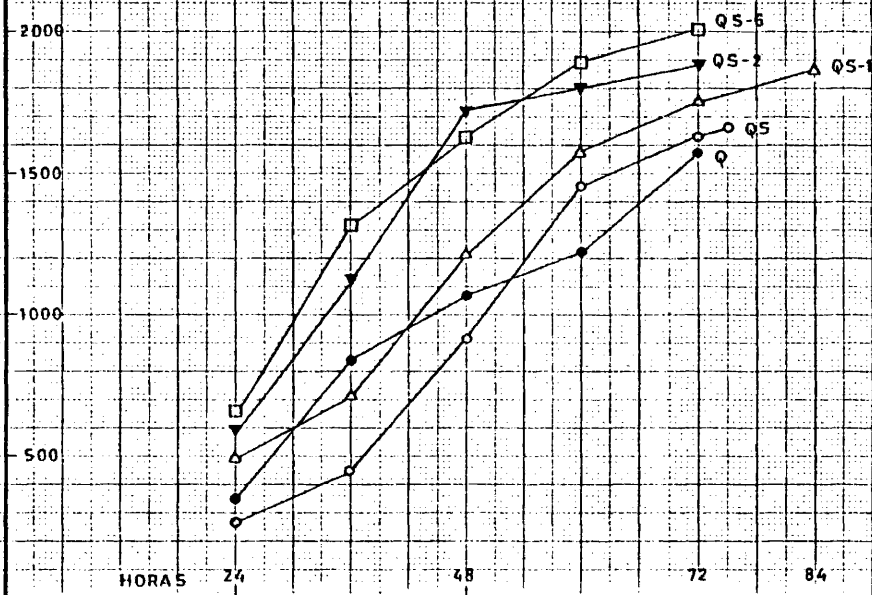


TABLA 3

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de cultivo.

Medios Q, (Testigo); QS; QS-1; QS-2 y QS-6.

Actividades Queratinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|----------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| Medio Q (Testigo) | 21 | 1.439 | 1.582 | 1.726 | 68 | 19 |
| Medio QS | 18 | 1.466 | 1.640 | 1.814 | 82 | 21 |
| Medio QS-1 | 16 | 1.638 | 1.834 | 2.031 | 92 | 20 |
| Medio QS-2 | 17 | 1.596 | 1.869 | 2.143 | 128 | 28 |
| Medio QS-6 | 14 | 1.781 | 1.996 | 2.211 | 99 | 18 |

154

UQ/ml
3500

GRAFICA 3

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de cultivo.

Medios Q, (Testigo); QS; QS-1; QS-2 y QS-6.

Actividades Queratinolíticas.

Representación de la tabla 3.

2500

2000

1500

1000

500

MEDIOS

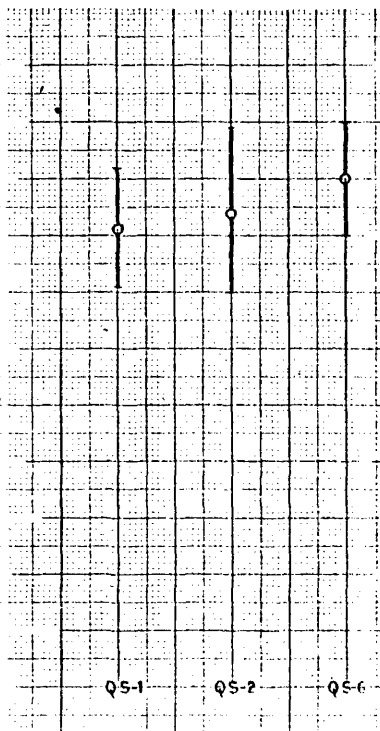
Q

Q

QS-1

QS-2

QS-6



FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN PLAN-
TA SEMIPILOTO.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28º, 32º, 36º y 40º C.

Las temperaturas a las cuales realizamos el ensayo - fueron las de 28º C, 32º C, 36º C y 40º C, observándose que para el caso de las actividades queratinolíticas UQ/ml, el valor máximo se - alcanza a 40º C.

Del mismo modo se comprueba que esta temperatura - de 40º C es la óptima para obtener el valor máximo de actividad hemo- globinolítica, UA/ml.

En las curvas 4 y 5, se puede ver claramente la evolu- ción de las actividades hemoglobinolítica y queratinolítica a lo largo del proceso. Hay una clara tendencia en el incremento en ambas acti- vidades, con el aumento de la temperatura y del tiempo; los valores

máximos obtenidos eran a 40º C y 72-96 horas en ambos casos.

En las tablas 4 y 5 se exponen los valores promedio de las actividades queratinolíticas, UQ/ml. y hemoglobinolíticas, UA/ml. respectivamente, obtenidos con el medio QS-6 a diferentes temperaturas.

En las gráficas 4 y 5, se representan los valores promedio y márgenes de confianza de las actividades queratinolíticas y hemoglobinolíticas, respectivamente.

Los valores promedio obtenidos en las valoraciones de las actividades queratinolíticas y hemoglobinolíticas a las temperaturas de 36º y 40º C son muy semejantes, por lo que seleccionamos como temperatura más conveniente la de 37º C, por ser aproximadamente un valor medio entre ambas y el que permitía realizar un trabajo más cómodo al haber en el laboratorio cuartos acondicionados a esta temperatura para mesas de agitación, inóculos, esterilidades, etc., etc.

157

UQ/ml

CURVA 4

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28°; 32°; 36° y 40° C.

Actividades Queratinolíticas.

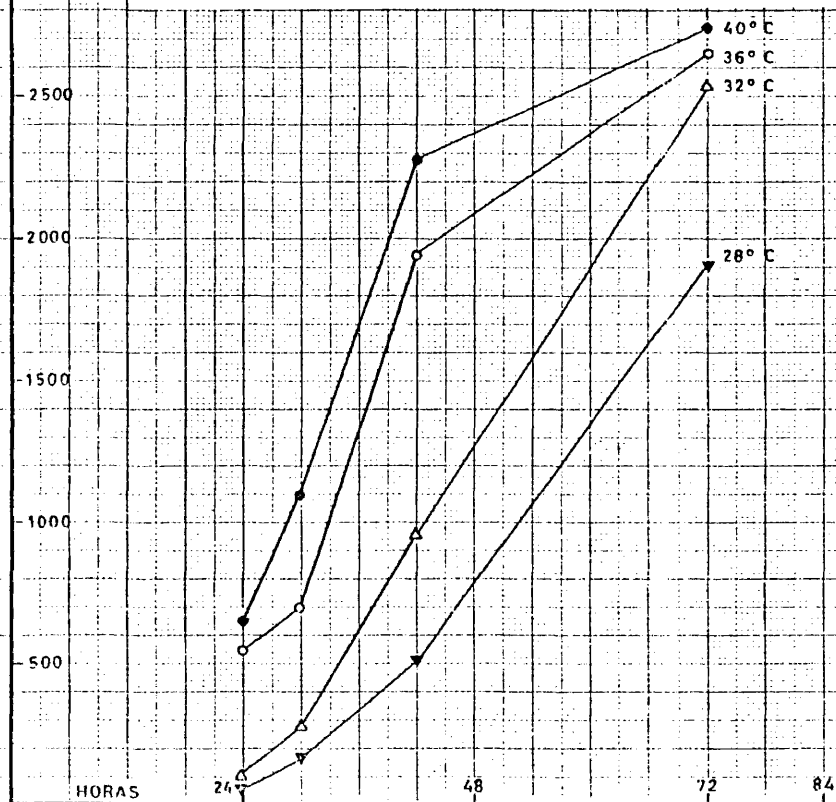


TABLA 4

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28º; 32º; 36º y 40º C.

Actividades Queratinolíticas

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|----------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| 28º C | 15 | 1.677 | 1.912 | 2.147 | 109 | 22 |
| 32º C | 13 | 1.982 | 2.553 | 3.125 | 256 | 36 |
| 36º C | 20 | 2.340 | 2.640 | 2.939 | 142 | 24 |
| 40º C | 14 | 2.586 | 2.750 | 2.914 | 75 | 10 |

159

UQ/ml

3.500

3.000

2.500

2.000

1.500

1.000

500

GRAFICA 4

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28°; 32°; 36° y 40°C.

Actividades Queratinolíticas.

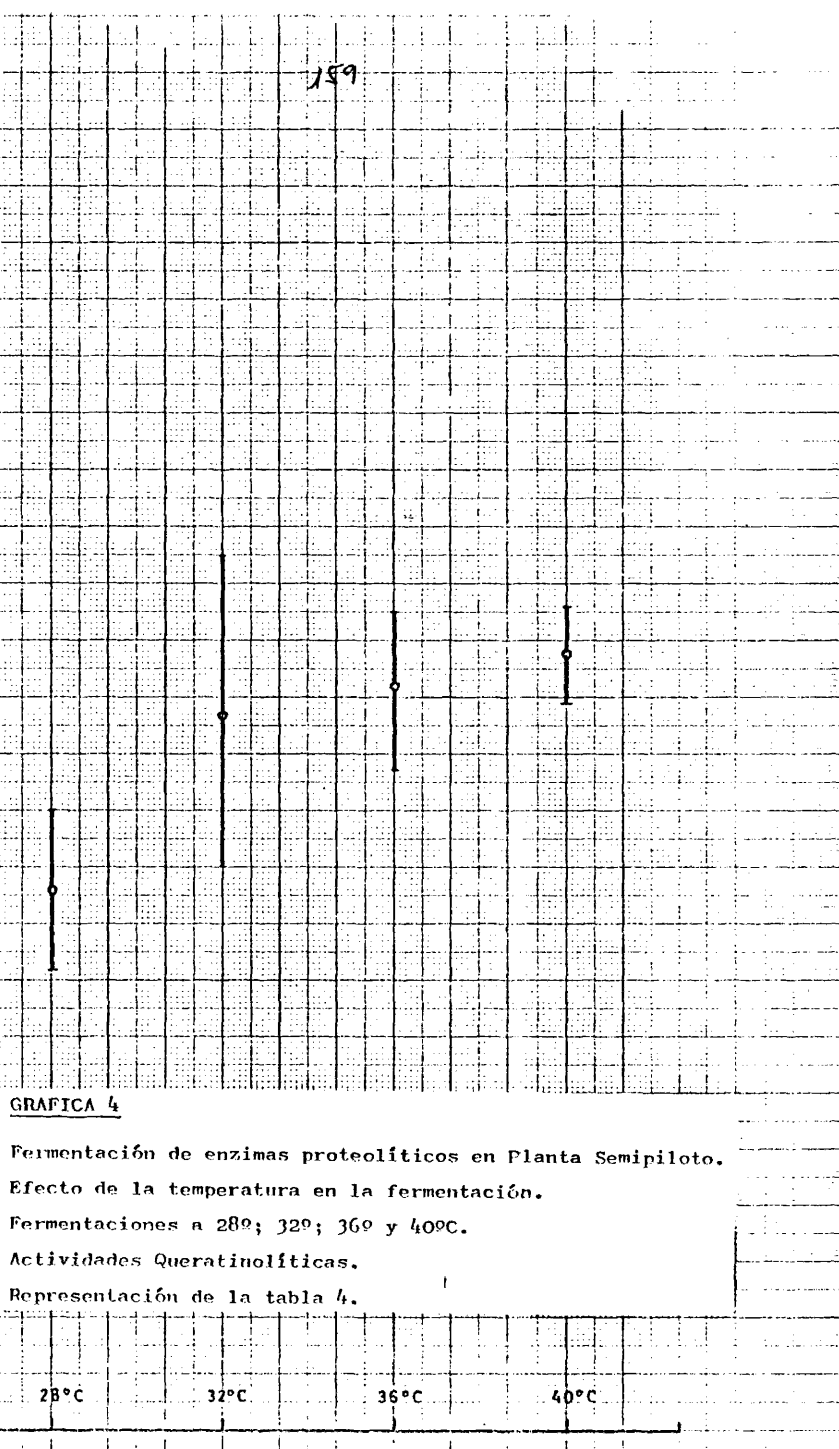
Representación de la tabla 4.

28°C

32°C

36°C

40°C



160

UA/ml

12.000

11.000

10.000

9.000

8.000

7.000

6.000

5.000

4.000

3.000

2.000

1.000

0

HORAS

24

48

72

CURVA 5

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28°; 32°; 36° y 40° C.

Actividades Hemoglobinolíticas.

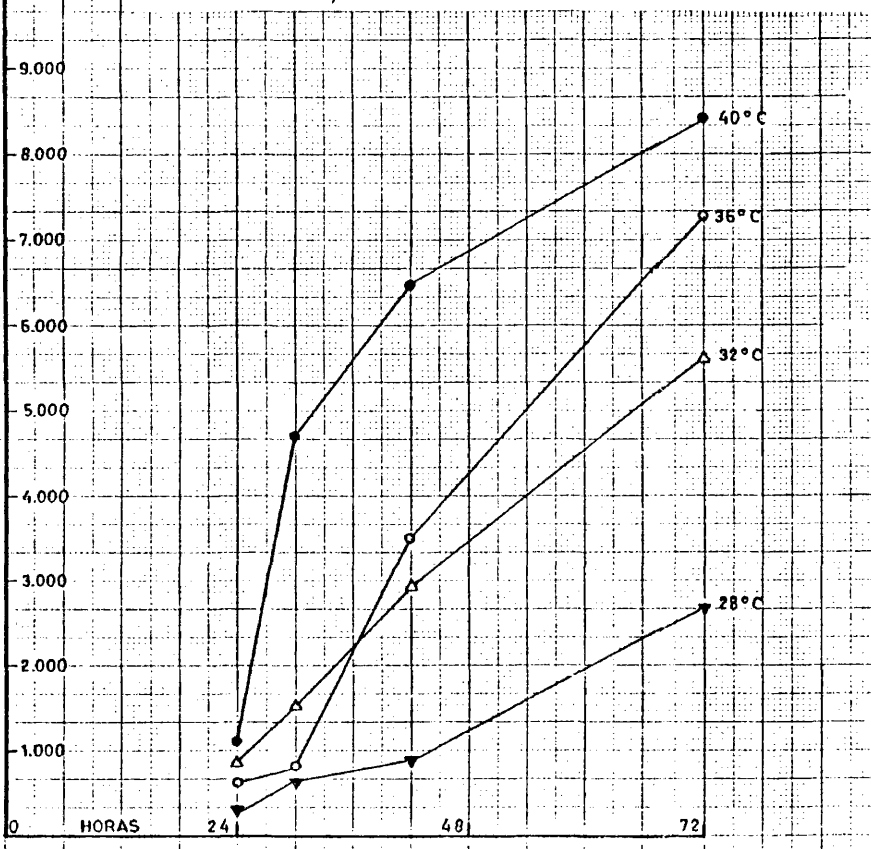


TABLA 5

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28º; 32º; 36º y 40º C.

Actividades Hemoglobinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|----------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| 28º C | 15 | 2.379 | 2.666 | 2.952 | 133 | 19 |
| 32º C | 20 | 4.959 | 5.597 | 6.235 | 304 | 24 |
| 36º C | 20 | 6.991 | 7.404 | 7.817 | 197 | 11 |
| 40º C | 20 | 8.029 | 8.276 | 8.523 | 117 | 6 |

162

UA/ml

12.000

11.000

10.000

9.000

8.000

7.000

6.000

5.000

4.000

3.000

2.000

1.000

GRAFICA 5

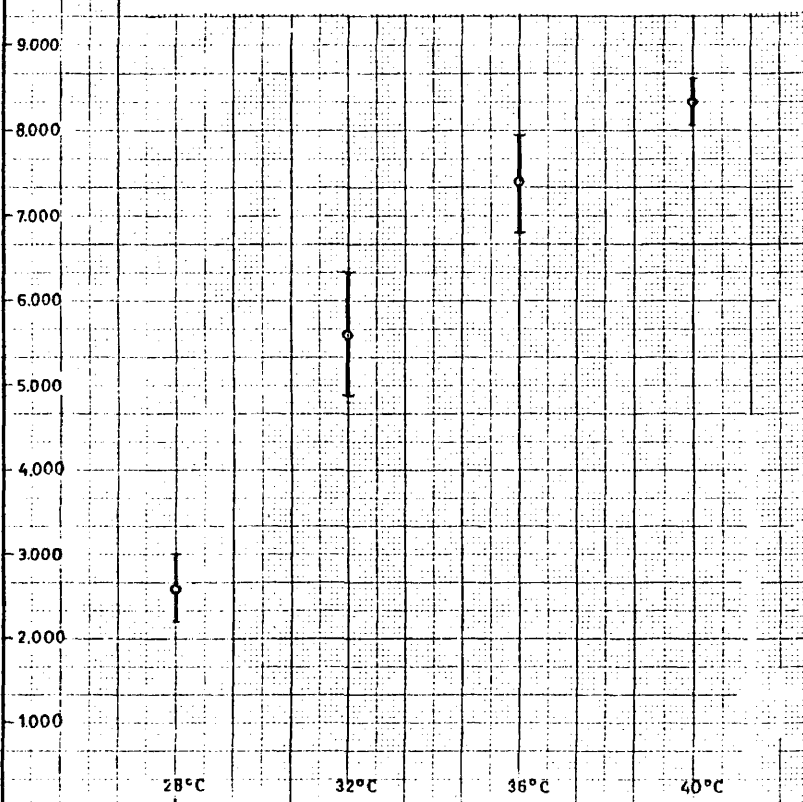
Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28º; 32º; 36º y 40º C.

Actividades Hemoglobinolíticas.

Representación de la tabla 5.



FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN PLAN-
TA SEMIPILOTO.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28º, 32º, 36º y 40º C.

Evolución del pH.

En la curva 5/1, vemos la variabilidad del pH en el ensayo realizado con el medio QS-6, a diferentes temperaturas.

El pH inicial del medio de cultivo QS-6 fue de 7,2-7,3. Durante las primeras 24 horas del proceso hay una disminución del pH en las cuatro temperaturas ensayadas. Entre las 24 y 36 horas, se inicia un aumento alcanzando prácticamente el valor inicial a las temperaturas de 28º y 36º C, manteniéndose un ligero descenso del pH a valores 6,7 a 6,8 para la temperatura de 32ºC. Sin embargo a la temperatura de 40ºC se aprecia un rápido ascenso en los valores del pH llegando éste a alcanzar un valor de 7,5.

De las 36 a las 48 horas, se observa que a 32º C aumenta nuevamente el pH y alcanza el mismo valor que había al comienzo -

de la experiencia, (7,25) y a las temperaturas de 28º, 36º y 40º C, se vé una notable elevación del pH, significativamente mayor a 40ºC, en que se alcanzan valores de pH 8,0.

A partir de las 48 horas de proceso, asciende el pH en todos los casos, con los valores máximos aproximadamente a las 65 horas.

El valor del pH más alto (8,49), se alcanzó con la fermentación realizada a 40º C.

165

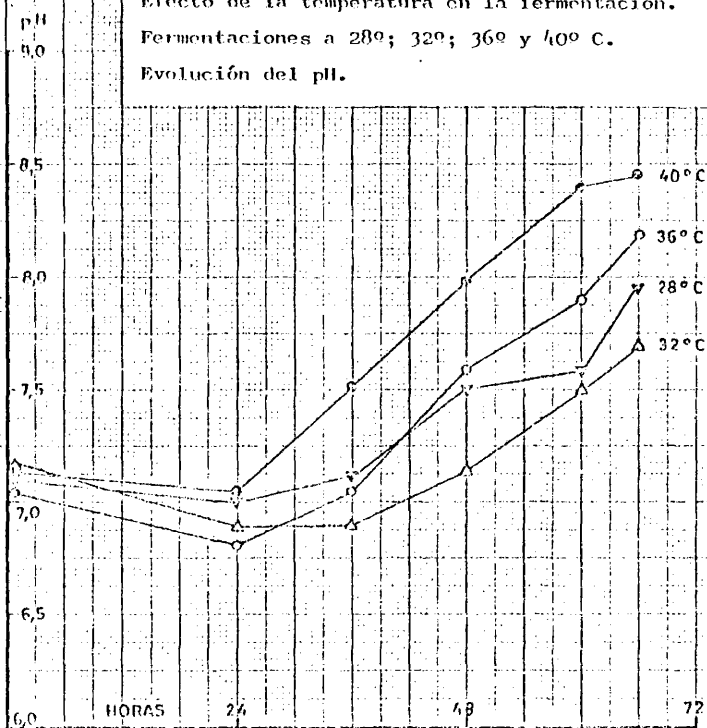
CURVA 5/1

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Scimpiloto.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28°; 32°; 36° y 40° C.

Evolución del pH.



FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN
PLANTA SEMIPILOTO.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28º; 32º; 36º y 40ºC.

Evolución del Azúcar.

Se puede ver en la curva 5/2, la evolución del consumo de Azúcar a diferentes temperaturas y horas de proceso.

A 40ºC, se produce un rápido aumento del consumo - de azúcar hasta las 36 horas de proceso, con un valor mínimo de - 0,25 mg/ml.

El resto del proceso se mantiene en estos valores inapreciables - prácticamente 0 -.

A 36º C, el máximo consumo se alcanza a las 48 horas siendo de 1 mg/ml. la cantidad de azúcar medida, valor prácticamente igual al de 40ºC.

Si la temperatura es de 32° C., todo el proceso de consumo de azúcar es más lento, llegando al valor mínimo de 0,5 mg. a las 60 horas.

Cuando la temperatura es de 28° C, en las 12 primeras horas del proceso, no existe prácticamente consumo de azúcar, pero a partir de este tiempo se produce un rápido aumento del consumo hasta las 60 horas, con un valor final de 1 mg/ml.

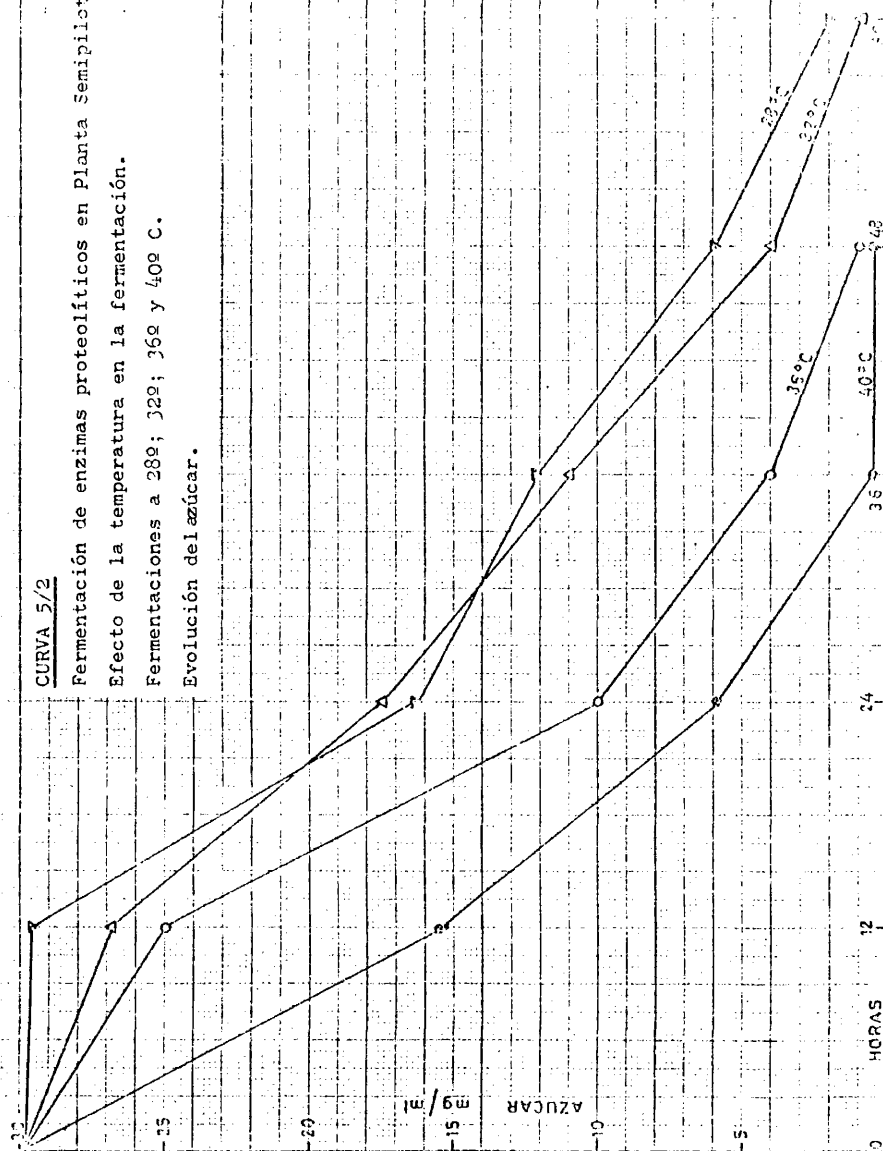
CURVA 5/2

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28°; 32°; 36° y 40° C.

Evolución del azúcar.



FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN PLAN-
TA SEMIPILOTO

Efecto de la temperatura en la fermentación

Fermentaciones a 28º, 32º, 36º y 40ºC.

Evolución del peso seco del micelio (P.M.V.)

La curva 5/3, nos permite ver la evolución del P.M.V. a diferentes temperaturas y horas de proceso.

Al comienzo de la experiencia, el valor del P.M.V. es de 10 mg/ml.; hay un aumento considerable a las 12 horas en todas las temperaturas ensayadas llegando a alcanzar valores de 38,0 mg/ml., 40,0 mg/ml., 31,9 mg/ml. y 32,0 mg/ml. a 28º, 32º, 36º y 40º C. - respectivamente.

La evolución apreciada a las temperaturas de 28º y 32º C. es muy semejante con valores máximos de 46,0 mg/ml. y 50,0 - mg/ml. respectivamente a las 36 horas del proceso y con valores mínimos y muy semejantes de 31,9 mg/ml. y 32,0 mg/ml. respectiva -

mente a las 60 horas.

Cuando el proceso se realiza a 36°C., el máximo valor de P.M.V. es de 40,2 mg/ml. a las 36 horas pero la diferencia entre este valor y el de las 24 horas es mínimo. Entre el período 36-48 horas se produce un rápido descenso del P.M.V. que continúa hasta las 60 horas con un valor mínimo de 28,0 mg/ml.

Con la temperatura de 40°C., el valor máximo de P.M.V. es de 40,0 mg/ml. a las 24 horas de proceso. A partir de este tiempo disminuye rápidamente y alcanza el mínimo valor a las 60 horas. Este valor coincide con el obtenido al comienzo del proceso.

171

P.M.V. mg/ml

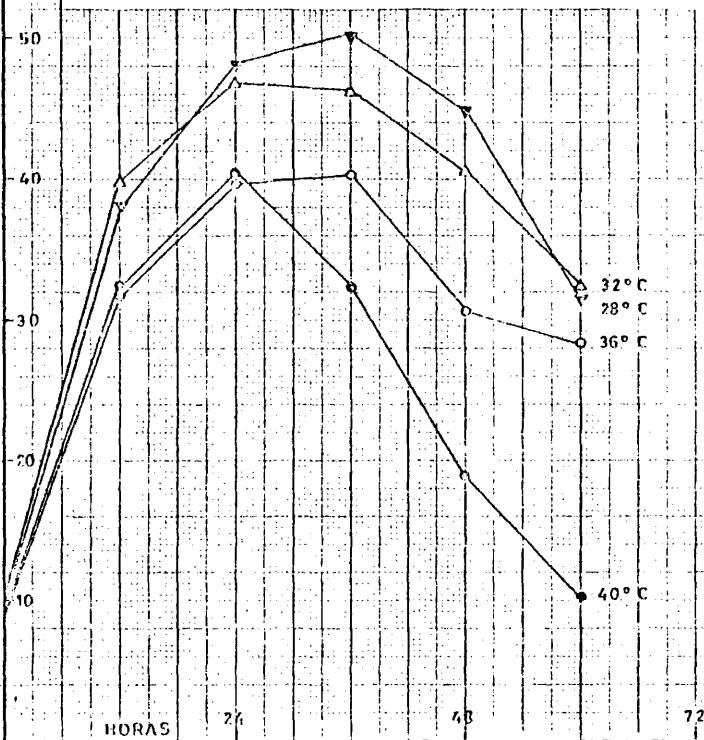
CURVA 5/3

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de la temperatura en la fermentación.

Fermentaciones a 28°; 32°; 36° y 40° C.

Evolución del peso seco del micelio (P.M.V.)



112

FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN
PLANTA SEMIPILOTO

Efecto de la aireación en la fermentación.

Fermentaciones con 0,5 litros/litro/minuto; 0,75 l/l/m.
y 1,0 l/l/m. de caudal de aire.

El caudal de aire empleado en las fermentaciones de la Planta Semipiloto era de 0,5 l/l/m. pero se pensó que, al igual que se habían aumentado los valores de las actividades hemoglobinolítica y queratinolítica, con la selección de medios de cultivo y temperaturas, podíamos ensayar variaciones en el caudal de aire para intentar aumentar la actividad. Por consiguiente pasamos a trabajar con cantidades de aire de 0,5 l/l/m.; 0,75 l/l/m. y 1,0 l/l/m.

La evolución que ha seguido el proceso según el caudal de aire suministrado, se puede ver en las curvas 6, para la actividad queratinolítica y 7 para la hemoglobinolítica; se aprecia una tendencia marcada al aumento de dichas actividades cuanto mayor sea la cantidad de aire suministrado. Los valores máximos se alcanzaron a las 72-96

horas, con un caudal de aire de 1,0 l/l/m.

Los datos estadísticos obtenidos con los valores de ambas actividades se resumen en las tablas 6 y 7.

En las gráficas 6 y 7, se representan los valores estadísticos promedio y márgenes de confianza de las actividades queratinolíticas y hemoglobinolíticas, respectivamente.

La velocidad de agitación en todas las fermentaciones efectuadas en la Planta Semipiloto era de 600 r.p.m. para los volúmenes a fermentar y había demostrado ser suficiente eficaz para obtener crecimientos miceliares buenos y abundantes. Cuando se aumentaban las revoluciones alrededor de aproximadamente a 750-800 r.p.m., en la mayoría de fermentaciones con Actinomyces, el tipo de crecimiento era bastante anormal formándose bolas y grumos y produciéndose normalmente la rotura del micelio a edades tempranas de fermentación.

Por lo tanto y por toda la experiencia acumulada en este tipo de fermentación a diferentes velocidades de agitación, no hemos creído oportuno variarlas para este trabajo.

Por lo que, como consecuencia de lo anterior, se establecieron las siguientes condiciones standard para el proceso de fermentación de enzimas proteolíticos en fermentadores de 8 litros:

- 174 -

Medio QS-6; 37° C de temperatura; 1,0 l/m. de caudal de aire y -
600 r.p.m. de agitación.

uq/
350

0

250

2

150

100

500

0 HORA

CURVA 6

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de la aireación en la fermentación.

Fermentaciones con 0,5 litros/litro/minuto; 0,75 l/l/m. y
1,0 l/l/m. de caudal de aire.

Actividades Queratinolíticas.

101

0,75 m

0,51/

78

TABLA 6

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de la aireación en la fermentación.

Fermentaciones con 0,5 litros/litro/minuto; 0,75 l/l/m. y 1,0 l/l/m. de caudal de aire.

Actividades Queratinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V.% |
|-------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|-------|
| 0,5 l/l/m. | 15 | 2.132 | 2.319 | 2.505 | 86 | 14 |
| 0,75 l/l/m. | 16 | 2.442 | 2.766 | 3.091 | 152 | 21 |
| 1,0 l/l/m. | 17 | 3.659 | 4.017 | 4.374 | 168 | 17 |

117

UQ/ml

7.000

GRAFICA 6

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de la aireación en la fermentación.

Fermentaciones con 0,5 litros/litro/minuto; 0,75 l/l/m. y 1,0 l/l/m. de caudal de aire.

Actividades Queratinolíticas.

Representación de la tabla 6.

5.000

4.000

3.000

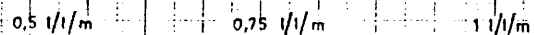
2.000

1.000

0,5 l/l/m

0,75 l/l/m

1 l/l/m



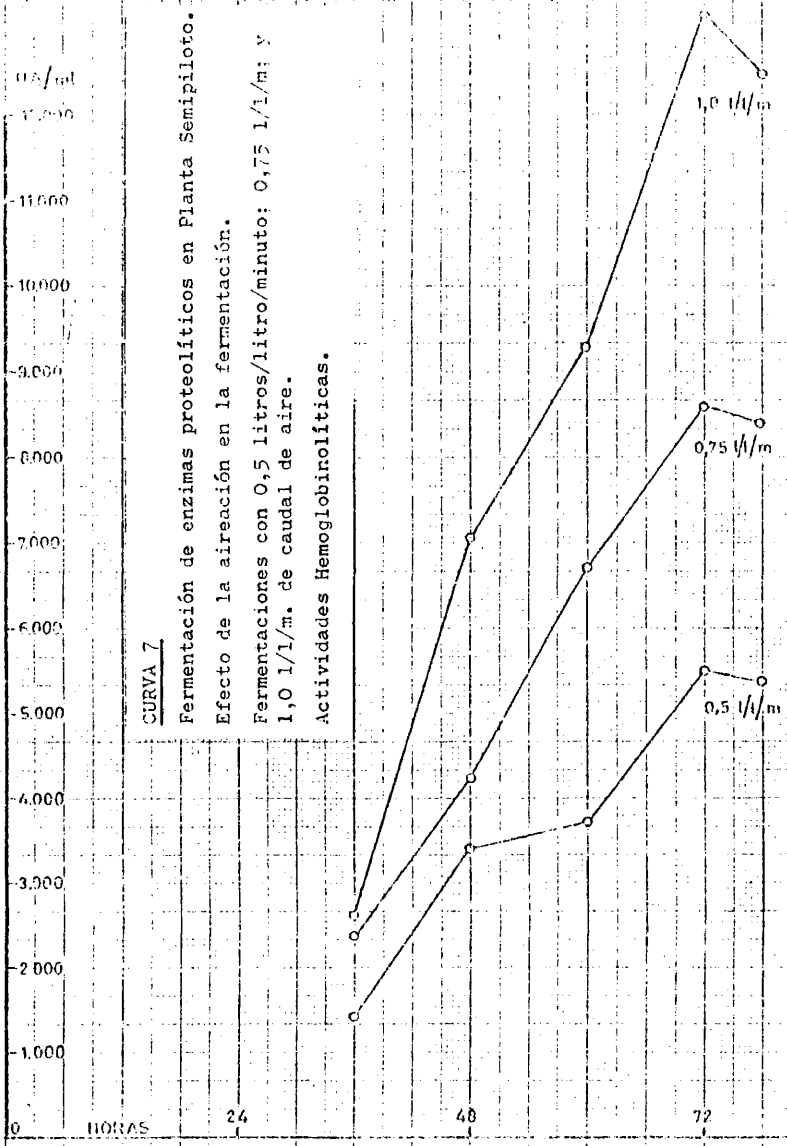


TABLA 7

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

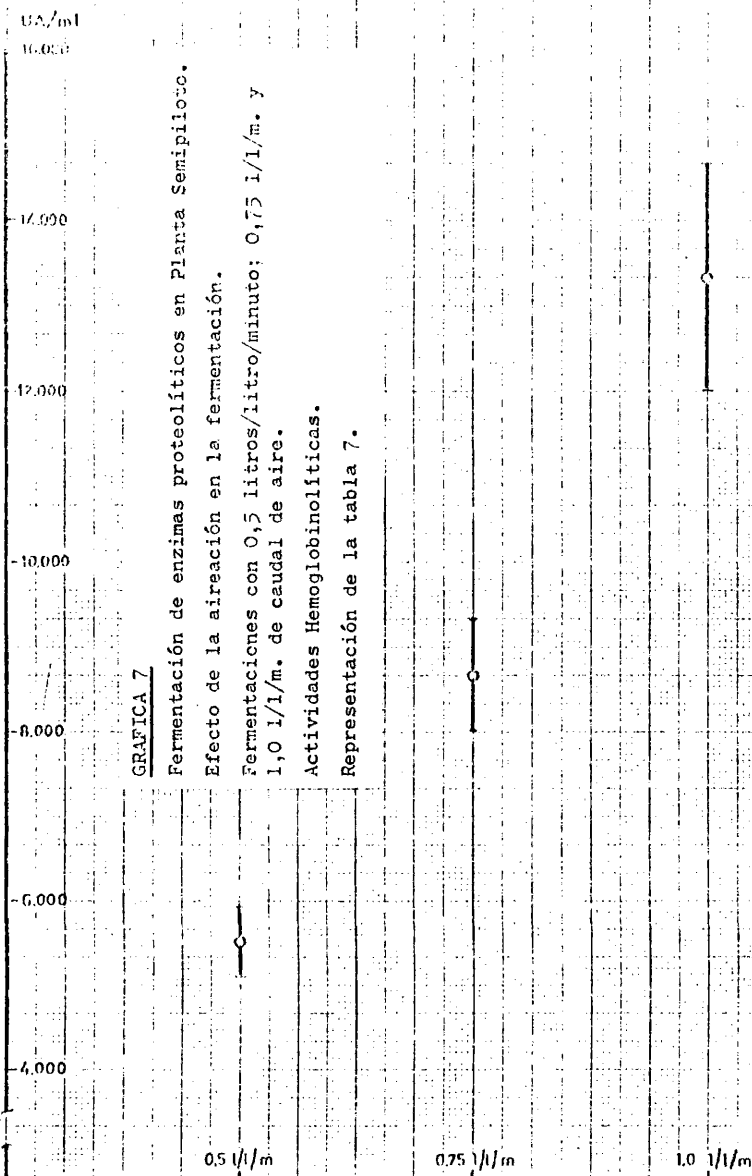
Efecto de la aireación en la fermentación.

Fermentaciones con 0,5 litros/litro/minuto; 0,75 l/l/m; y 1,0 l/l/m. de caudal de aire.

Actividades Hemoglobinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|-------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| 0,5 l/l/m. | 11 | 5.178 | 5.556 | 5.935 | 186 | 20,4 |
| 0,75 l/l/m. | 17 | 8.016 | 8.659 | 9.302 | 303 | 14 |
| 1,0 l/l/m. | 19 | 12.024 | 13.329 | 14.635 | 621 | 20 |



FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN PLAN-
TA SEMIPILOTO.

Efecto de la adición de nutrientes durante la fermentación.

Medios QS-6; (Testigo), QS-1/1; QS-6/2 y QS-6/3.

Una vez establecidas las nuevas condiciones estándar en las que se debía realizar el proceso, se planteó como una de las pruebas en este trabajo, el adicionar durante el curso de la fermentación, nutrientes y sobre todo glucosa para complementar el medio de cultivo inicial.

Se partió de una concentración de glucosa en el medio, de 30 g/l que hacia las 40 horas de fermentación había desaparecido prácticamente.

Para tratar de mantener una concentración de 10-15 g/l de glucosa durante más tiempo y conservar la fermentación en niveles satisfactorios y con objeto de aumentar, por mayor duración de la fermentación, la producción de actividad, se hicieron, indepen-

dientemente de otros nutrientes, adiciones de glucosa.

Las curvas 8 y 9, representan la evolución seguida por la actividad queratinolítica y hemoglobinolítica, en las fermentaciones realizadas con estas adiciones, que se hicieron a las 30 y 48 horas de proceso, añadiendo, en las cantidades señaladas en los medios de cultivo correspondientes, harina de soja, dextrosa, "Proflo" y polvo de -
pezuña.

Las tablas 8 y 9, presentan respectivamente los datos estadísticos de las actividades queratinolíticas y hemoglobinolíticas, obtenidas al efectuar estas adiciones al medio de cultivo inicial. Si se comparan los valores de estas tablas, con los obtenidos cuando no hay ningún tipo de adición, puede verse que no solamente no se ha producido un aumento de actividad que se pueda considerar como beneficiosa, sino que en ningún caso es superior al testigo.

Las gráficas 8 y 9, corresponden a la representación de los valores promedios y márgenes de confianza de las actividades queratinolíticas y hemoglobinolíticas, respectivamente.

En la curva 9/1 se representa la marcha total del consumo de glucosa, (promedio de fermentaciones realizadas sin adiciones), así como la variación sobre la misma cuando se realizaron adicio -

nes de glucosa a las 30 y 48 horas de proceso, determinándose inmediatamente antes y después de dichas adiciones.

Como se ve en dicha curva, la glucosa añadida se consume también entre las 6 y 12 horas siguientes a las adiciones, por lo que este consumo tan rápido nos llevó a pensar que la glucosa en las condiciones de estas pruebas no es aprovechada por el Streptomyces - fradiae, sino degradada.

En la curva 9/2, vemos que analizado el consumo de glucosa, muestra éste un período inicial de unas tres horas en el que no hay disminución, coincidiendo con la fase de reposo del micelio. A partir de la tercera hora del proceso, se inició un consumo muy rápido que determina la desaparición total del azúcar entre las 30 y 40 horas de fermentación. La velocidad de consumo entre las 5 y 20 horas de fermentación es de 1,62 g/l/hora.

un/ml

CURVA 3

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.

Medios QS-6; QS-6/1; QS-6/2 y QS-6/3

Actividades Queratinolíticas.

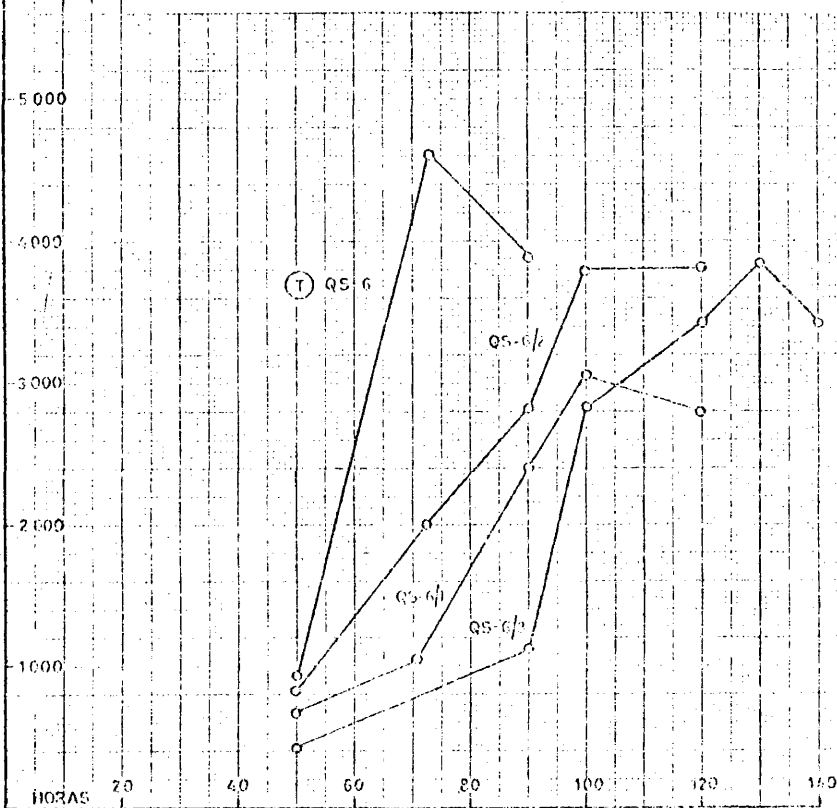


TABLA 8

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.

Medios QS-6; QS-6/1; QS-6/2 y QS-6/3

Actividades Queratinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|-----------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| Medio QS-6 Testigo | 12 | 4.361 | 4.692 | 5.022 | 149 | 11 |
| Medio QS-6/1 | 20 | 2.691 | 3.071 | 3.452 | 181 | 26 |
| Medio QS-6/2 | 10 | 3.146 | 3.876 | 4.607 | 323 | 26 |
| Medio QS-6/3 | 7 | 3.209 | 3.959 | 4.709 | 306 | 20 |

mg/ml

7.000

6.000

5.000

4.000

3.000

2.000

1.000

GRAFICA 8

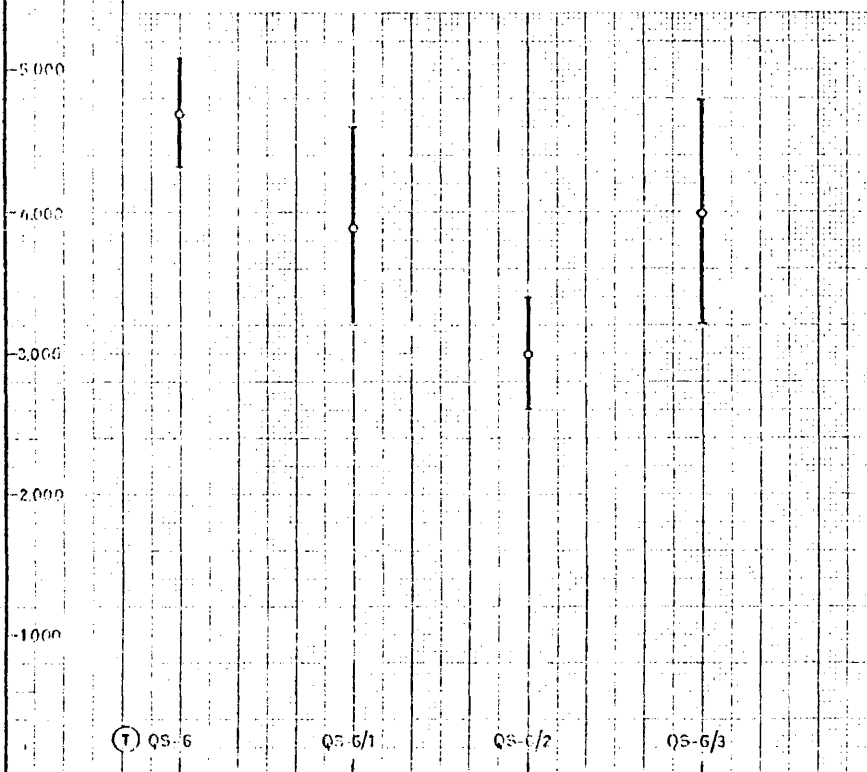
Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.

Medios QS-6; QS-6/1; QS-6/2 y QS-6/3.

Actividades Queratinolíticas.

Representación de la tabla 8.



CURVA 9

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Scapileto

Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.

Medias QS-6; QS-6/1; QS-6/2 y QS-6/3.

Actividades Hemoglobinolíticas.

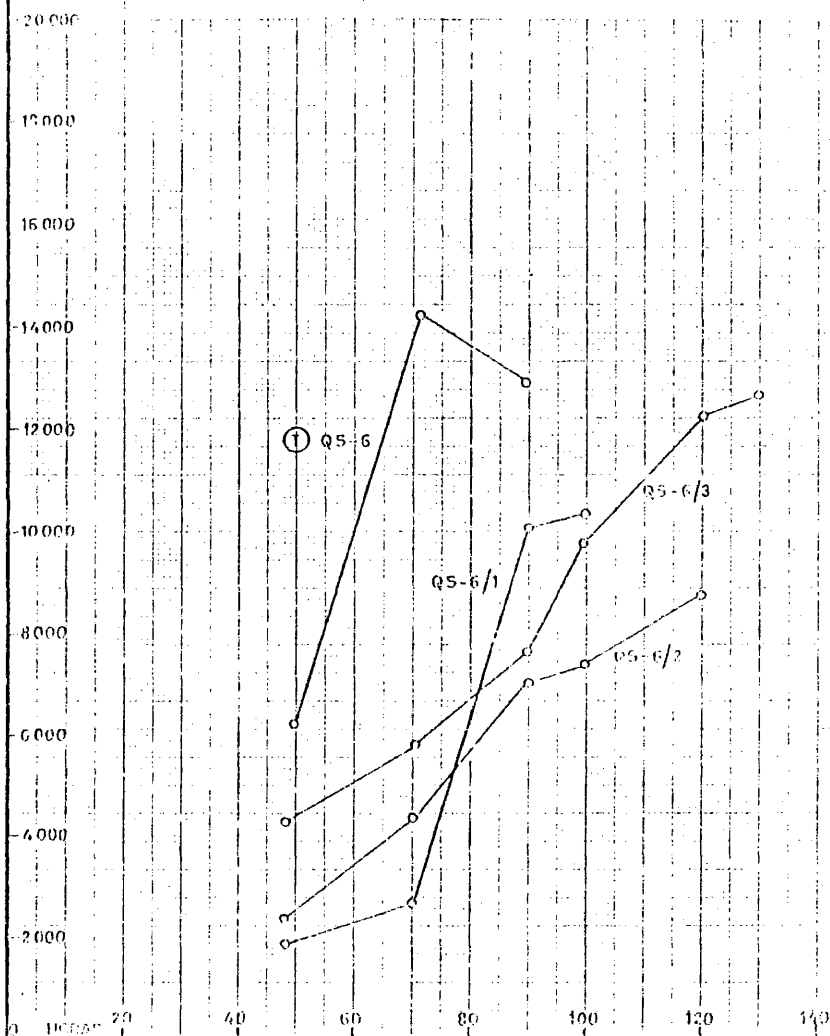


TABLA 9

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.

Medios QS-6; QS-6/1; QS-6/2 y QS-6/3

Actividades Hemoglobinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|-----------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| Medio QS-6 Testigo | 22 | 13.622 | 14.464 | 15.306 | 404 | 13 |
| Medio QS-6/1 | 14 | 9.903 | 10.517 | 11.131 | 284 | 10 |
| Medio QS-6/2 | 18 | 8.321 | 8.821 | 9.321 | 236 | 11 |
| Medio QS-6/3 | 23 | 12.115 | 12.604 | 13.092 | 235 | 8 |

24.000
22.000
20.000
18.000
16.000
14.000
12.000
10.000
8.000
6.000
4.000
2.000

GRAFICA 9

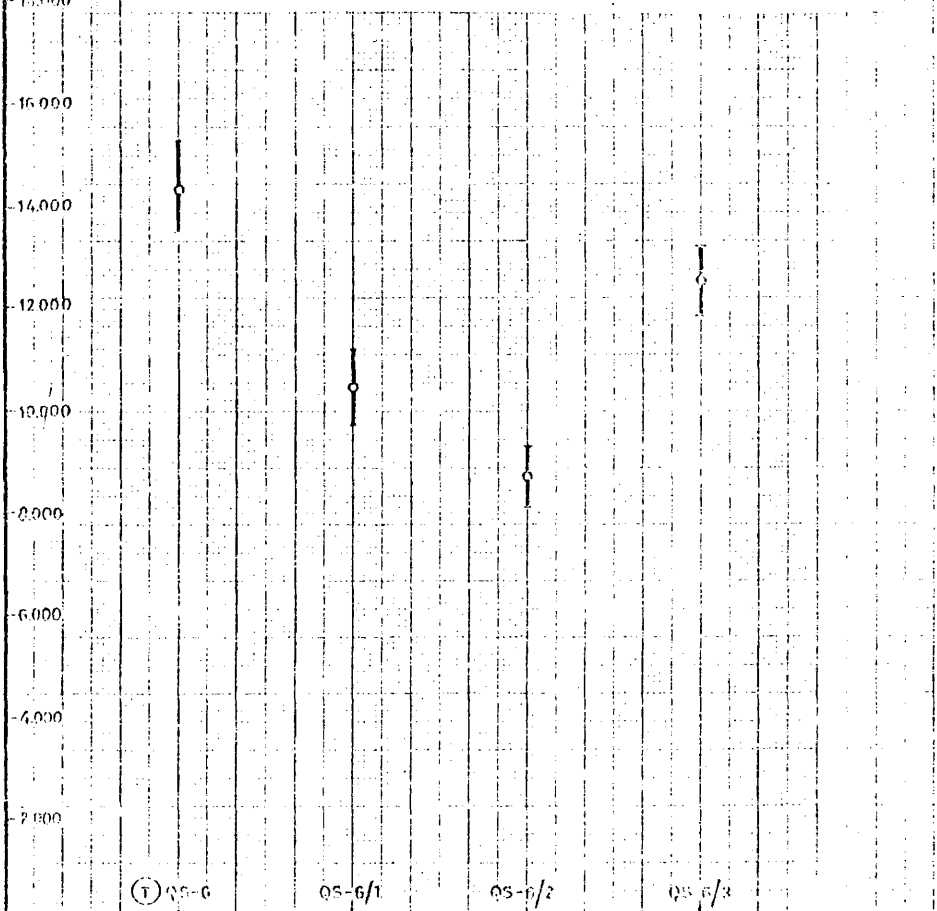
Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.

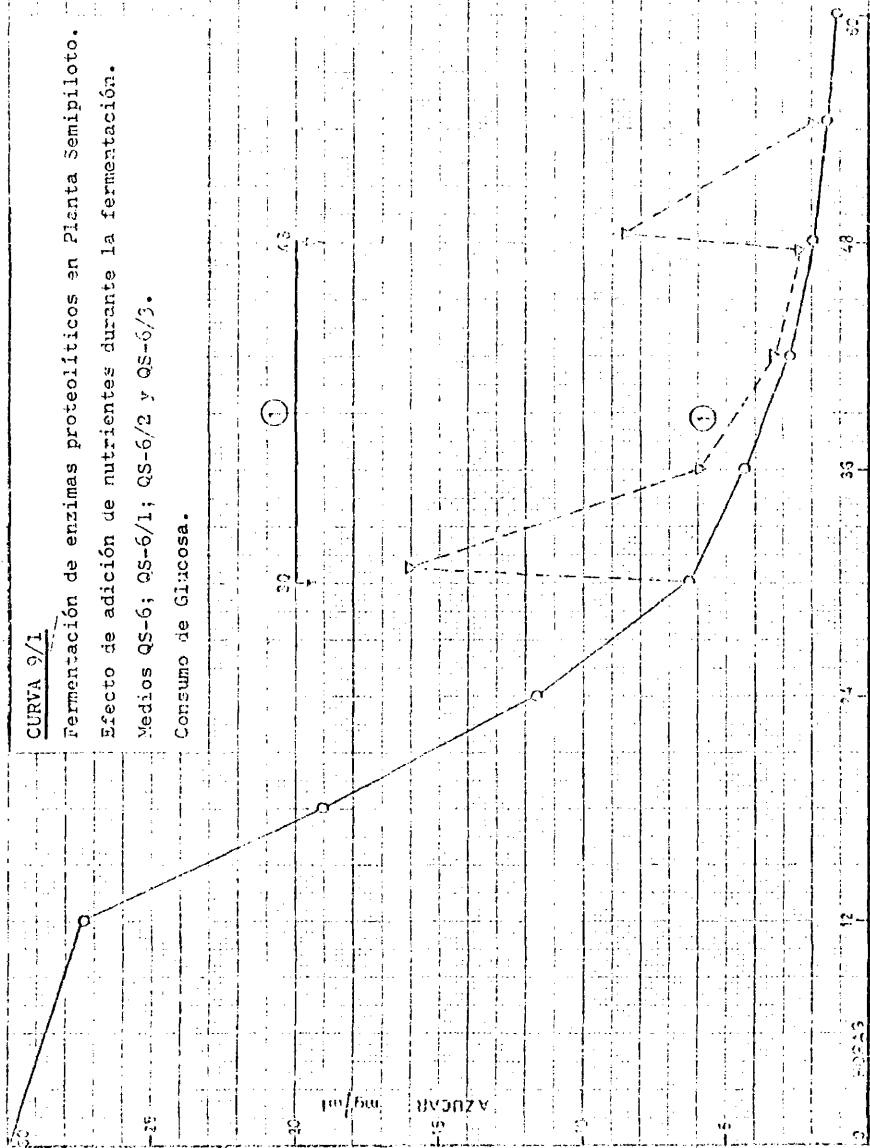
Medios QS-6; QS-6/1; QS-6/2 y QS-6/3.

Actividades Hemoglobinolíticas.

Representación de la tabla 9.



CURVA 9/1
 Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.
 Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.
 Medios QS-6; QS-6/1; QS-6/2 y QS-6/3.
 Consumo de Glucosa.



191

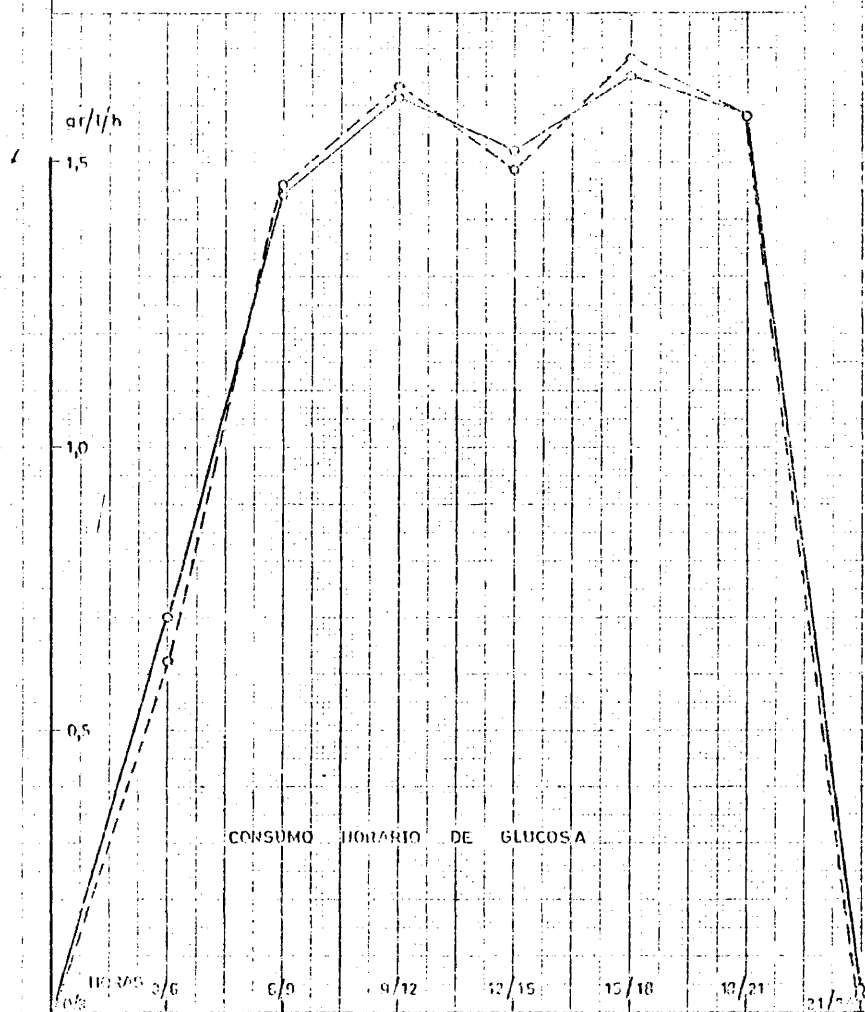
CURVA 9/3

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.

Medios QS-6; QS-6/1; QS-6/2 y QS-6/3.

Consumo horario de glucosa.



FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN
PLANTA SEMIPILOTO.

Selección de medios de cultivo.

Medios QS-6 (Testigo); 1, 2, 3, 4 y 5.

Sobre estas nuevas condiciones de fermentación establecidas; 37°C, 1,01/1/m., 72-96 horas y medio QS-6, ensayamos - otros varios medios, que se describen en el apartado correspondiente, para tratar de mejorar las actividades obtenidas hasta entonces.

En las curvas 10 y 11 se vé la evolución seguida por las actividades queratinolítica y hemoglobinolítica, a lo largo de la fermentación.

La actividad queratinolítica, los valores promedios máximos para los medios QS-6, 1, 2, 3 y 4 se han obtenido a las - 72 horas de proceso, a diferencia del medio 5, que dió el máximo de actividad a las 84 horas. La actividad queratinolítica más alta se obtuvo con el medio 4.

En actividad hemoglobinolítica, dieron su máximo valor a las 72 horas, los medios Testigo, 2 y 3. A las 60 horas solamente el medio 1, y los medios 4 y 5, a las 84 horas de proceso. El medio 2 dió la mayor actividad.

Es de destacar que con el medio 5, los valores promedios de actividad obtenidos, han sido muy bajos por lo que dicho medio es el menos recomendable.

Se hizo el estudio estadístico de los datos obtenidos con estas series de pruebas y sus resultados para las actividades queratinolítica y hemoglobinolítica, se exponen en las tablas 10 y 11, respectivamente.

En las gráficas 10 y 11, se han representado las actividades promedio y márgenes de confianza de las actividades queratinolítica y hemoglobinolítica.

Se ha seleccionado como mejor medio de cultivo el 2, por considerar que la actividad hemoglobinolítica valorada por el método de Anson, que es más específico para dicha actividad, tiene valores más fiables que las efectuadas por el método de pezuña para la actividad queratinolítica.

194

10-7-1
700

CURVA 10

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de cultivo.

(1000) Medios QS-6 (Testigo); 1; 2; 3; 4 y 5.

Actividades Queratinolíticas.

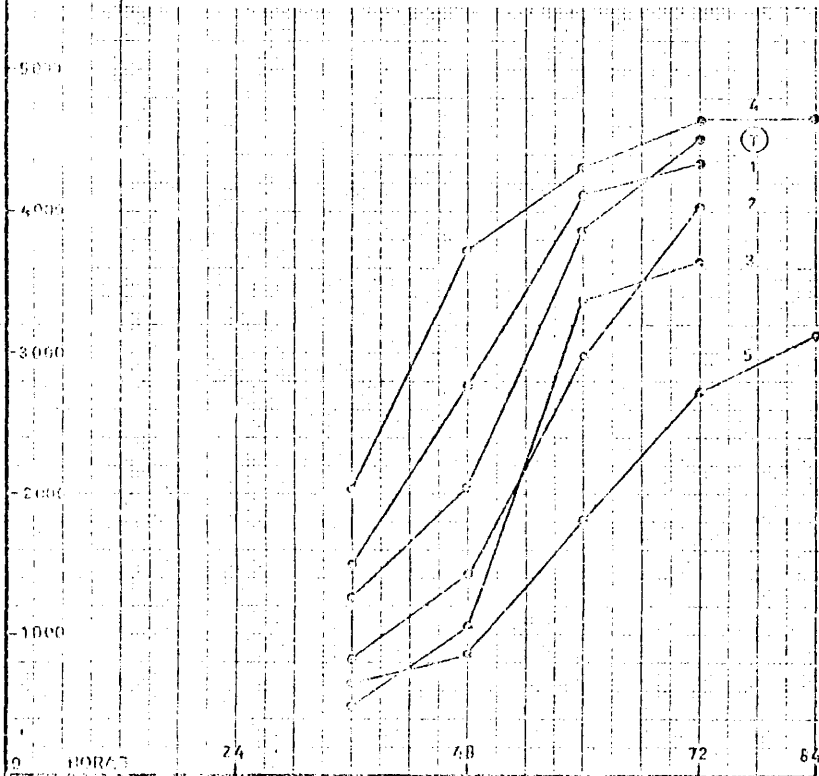


TABLA 10

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de cultivo.

Medios QS-6 (Testigo); 1; 2; 3; 4 y 5.

Actividades Queratinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|-----------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| Medio Testigo QS-6 | 10 | 4.070 | 4.526 | 4.983 | 201 | 14 |
| Medio 1 | 17 | 4.026 | 4.384 | 4.742 | 168 | 15 |
| Medio 2 | 13 | 3.472 | 4.006 | 4.539 | 244 | 22 |
| Medio 3 | 27 | 3.418 | 3.635 | 3.851 | 105 | 15 |
| Medio 4 | 15 | 4.278 | 4.606 | 4.933 | 152 | 12 |
| Medio 5 | 11 | 2.776 | 3.145 | 3.514 | 165 | 17 |

U./ml

7.000

6.000

5.000

4.000

3.000

2.000

1.000

0.000

-1.000

-2.000

-3.000

-4.000

-5.000

-6.000

-7.000

-8.000

-9.000

-10.000

-11.000

-12.000

-13.000

-14.000

-15.000

-16.000

-17.000

-18.000

-19.000

GRAFICA 10

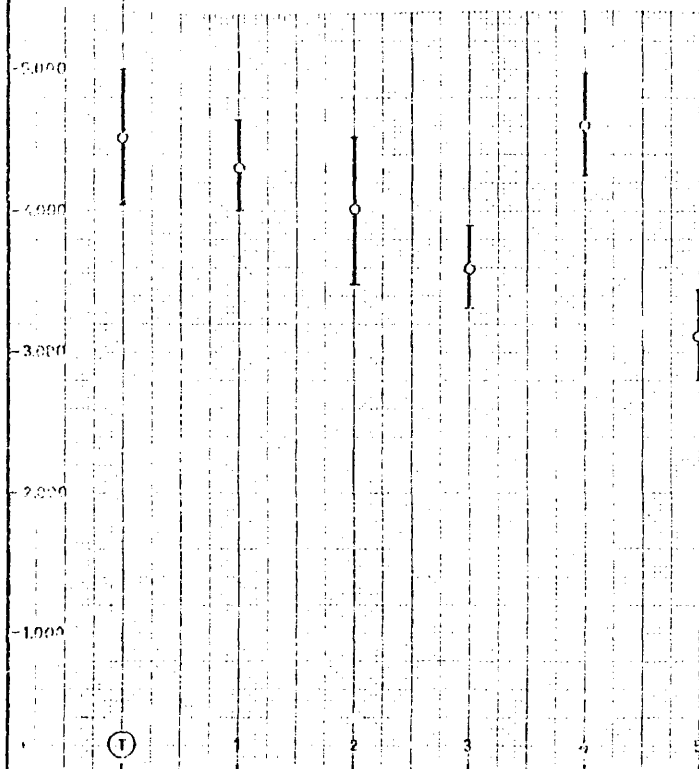
Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de cultivo.

Medios QS-6 (Testigo); 1; 2; 3; 4 y 5.

Actividades Queratinolíticas.

Representación de la tabla 10



197

CURVA 11

Fermentación de enzimas proteolíticas en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de cultivo.

Medios QS-6 (Testigo); 1; 2; 3; 4 y 5.

Actividades Hemoglobinolíticas.

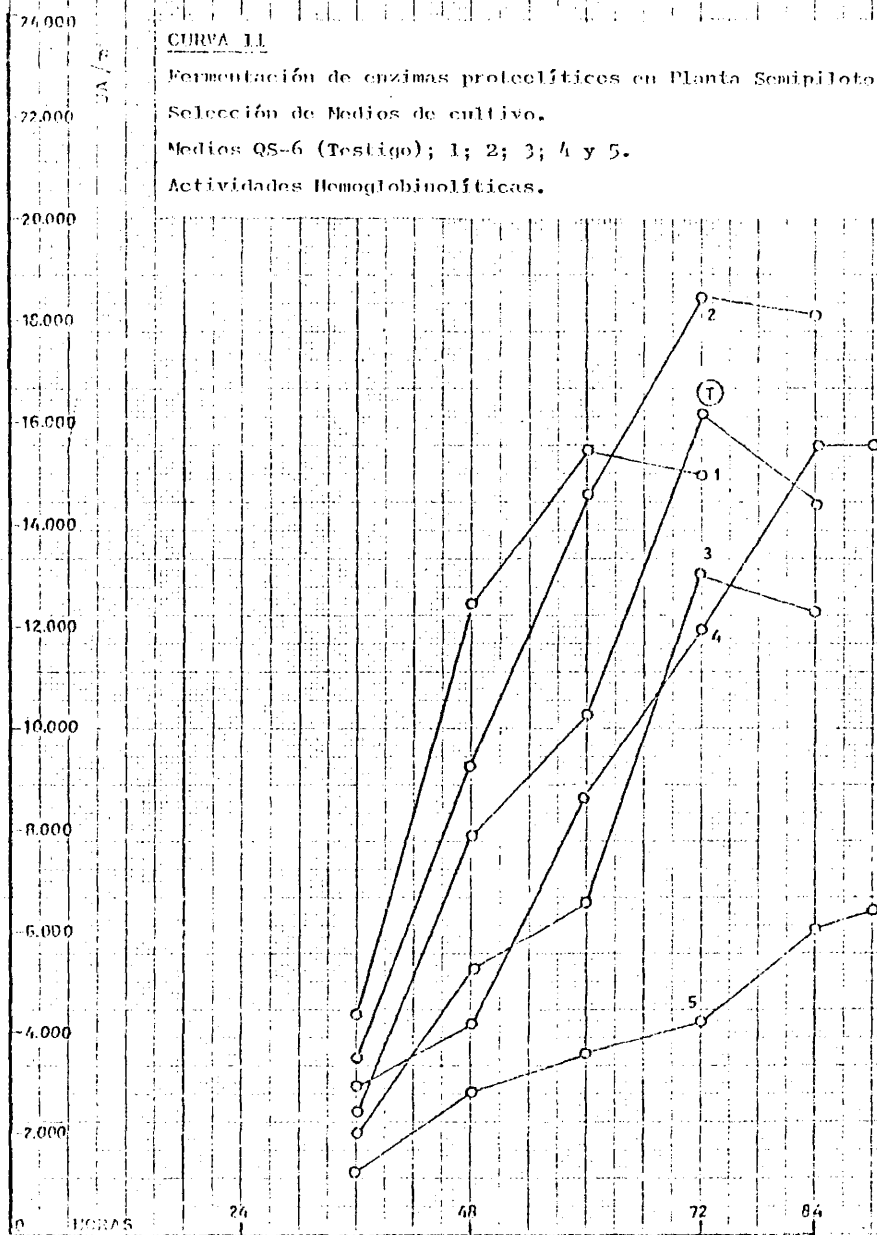


TABLA 11

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de cultivo.

Medios QS-6 (Testigo); 1; 2; 3; 4 y 5.

Actividades Hemoglobinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|-----------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| Medio Testigo QS-6 | 42 | 15.493 | 16.368 | 17.242 | 433 | 17 |
| Medio 1 | 20 | 14.598 | 15.459 | 16.319 | 411 | 11 |
| Medio 2 | 12 | 17.482 | 18.428 | 19.374 | 429 | 8 |
| Medio 3 | 12 | 10.688 | 13.048 | 15.407 | 1.072 | 28 |
| Medio 4 | 7 | 12.067 | 15.406 | 18.745 | 1.364 | 23 |
| Medio 5 | 6 | 5.400 | 6.009 | 6.618 | 236 | 9 |

GRAFICA 11

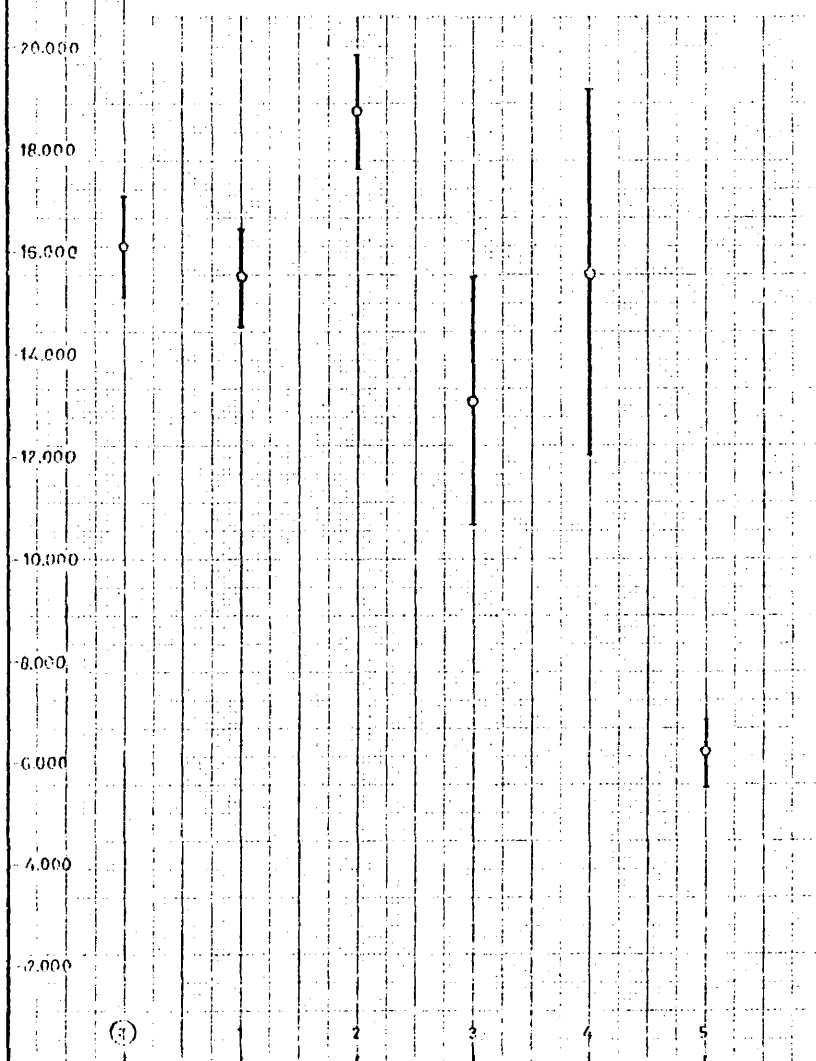
Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de cultivo.

Medios QS-6 (Testigo); 1; 2; 3; 4 y 5.

Actividades Hemoglobínicas.

Representación de la tabla 11.



FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN

PLANTA SEMIPILOTO

Selección de Medios de Cultivo y Colonias.

Medios : 2 (Testigo); SP/1; E-4; SP/2 y 2/1.

Colonias: Rosa asalmonado (Testigo), y Blanca.

La cepa de Streptomyces fradiae seleccionada, tiene un crecimiento abundante de color rosa asalmonado.

A lo largo de todo este trabajo se han hecho numerosas selecciones de colonias e inóculos, mediante modificaciones efectuadas en los medios de cultivo en el Laboratorio, para conseguir los inóculos y colonias que nos diesen actividades más altas, tanto hemoglobinolíticas como queratinolíticas. Se observó, desde el principio, la aparición de dos tipos de colonias; rosas y blancas. En la selección posterior de estas colonias, se vió que, de una sola colonia aislada de color rosa - salmón, a veces se obtenían colonias rosas y blancas.

Lo mismo ocurría cuando se partía de una colonia blanca aislada, que también se obtenían colonias blancas y rosas.

Se aislaron finalmente colonias blancas y rosas, puras y se estudiaron ambas colonias por separado, en cuanto a la producción de enzimas proteolíticos entre si y comparadas con la colonia tipo. La figura 19, muestra colonias aisladas blancas.

En la figura 20, se vé la diferencia de color en el crecimiento de colonias blancas y rosas, tanto en frascos Roux, como en matraces de inóculo.

Con los dos tipos de colonias obtenidas, se llevaron a cabo fermentaciones para seleccionar la mejor, en cuanto a producción de actividad proteolítica.

La curva 12, presenta la evolución seguida por la actividad queratinolítica. Claramente se vé que la colonia blanca en el medio E-4 ha sido la que dá actividad más alta, (6.088 UQ/ml.) actividad mayor que la conseguida por la colonia tipo rosa asalmonada, en el medio 2, (Testigo), a las 72 horas de fermentación.

En la curva, 13, se representa el curso seguido por las actividades hemoglobinolíticas, observándose que también en este caso se obtienen los valores máximos con la colonia blanca en el medio E-4 y a las 72 horas de fermentación 21.778 UA/ml. frente a 16.978 UA/ml. con el medio y la colonia testigo.

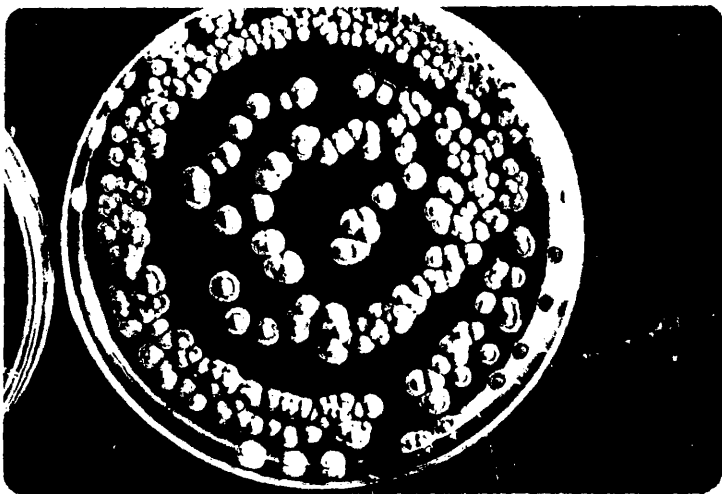
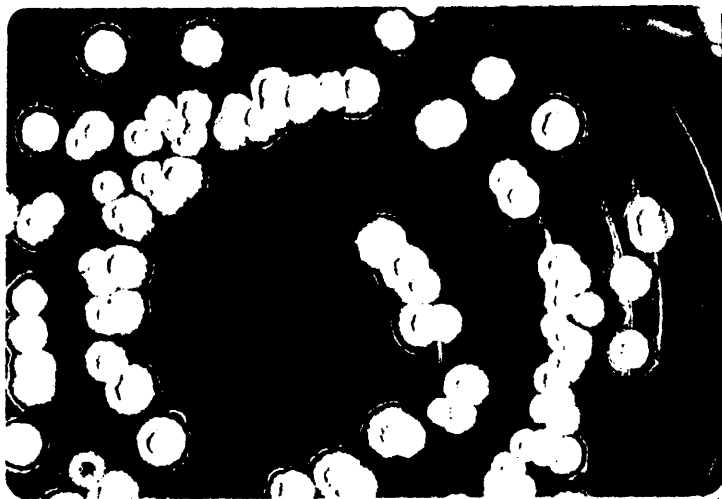


Figura 19



Figura 20

- 204 -

Los datos promedios de las actividades obtenidas que -
ratinolíticas y hemoglobinolíticas, se exponen en las tablas 12 y 13.

En las gráficas 12 y 13 se representan los valores pro-
medios y márgenes de confianza de las colonias blanca y rosa en los -
diferentes medios de cultivo.

CURVA 12

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de cultivo y colonias.

Uc/dl

Medios: 2 (Testigo); SP/1; E-4 y SP/2.

Colonias: Blanca y Rosa

Actividades Queratinolíticas.

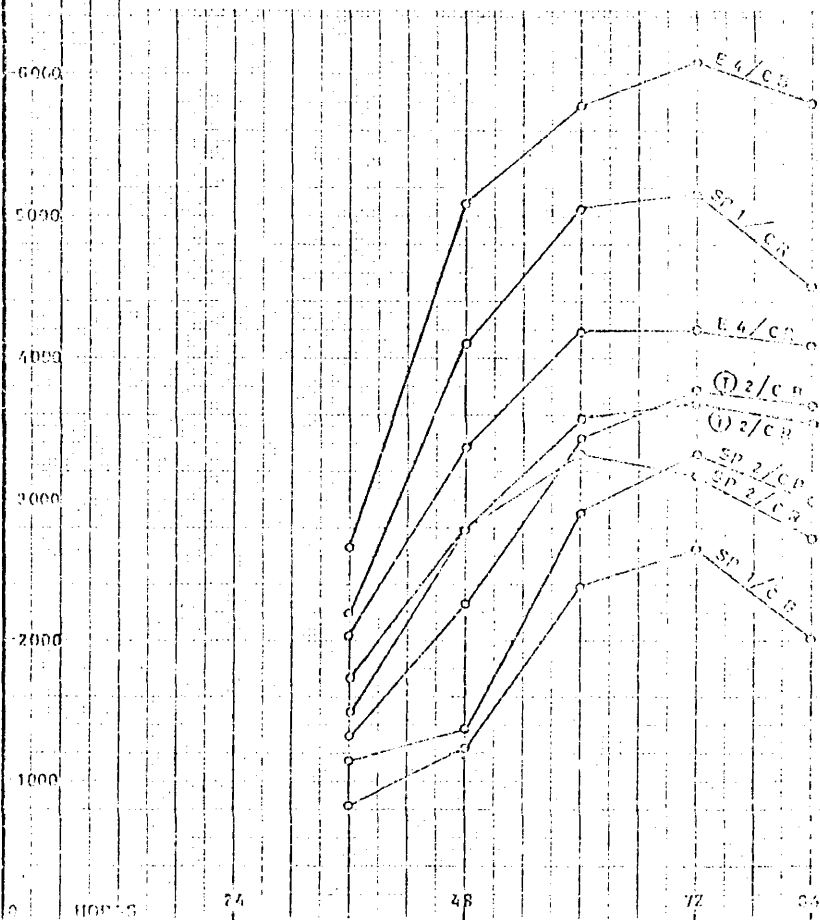


TABLA 12

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de cultivo y colonias.

Medios: 2 (Testigo); SP/1; E-4 y SP/2.

Colonias: Blanca y Rosa.

Actividades Queratinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|---------------------------|------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| Medio 2 Testigo | col. B. | 22 | 3.258 | 3.775 | 4.293 | 249 | 31 |
| | col. R. | 16 | 3.132 | 3.680 | 4.228 | 257 | 27 |
| Medio SP/1 | col. B. | 17 | 2.479 | 2.657 | 2.835 | 84 | 13 |
| | col. R. | 7 | 3.983 | 5.147 | 6.310 | 475 | 24 |
| Medio E-4 | col. B. | 25 | 5.373 | 6.088 | 6.802 | 346 | 28 |
| | col. R. | 39 | 4.011 | 4.207 | 4.404 | 97 | 14 |
| Medio SP/2 | col. B. | 6 | 1.934 | 3.352 | 4.770 | 551 | 40 |
| | col. R. | 7 | 2.504 | 3.404 | 4.304 | 367 | 28 |

GRAFICA 12

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

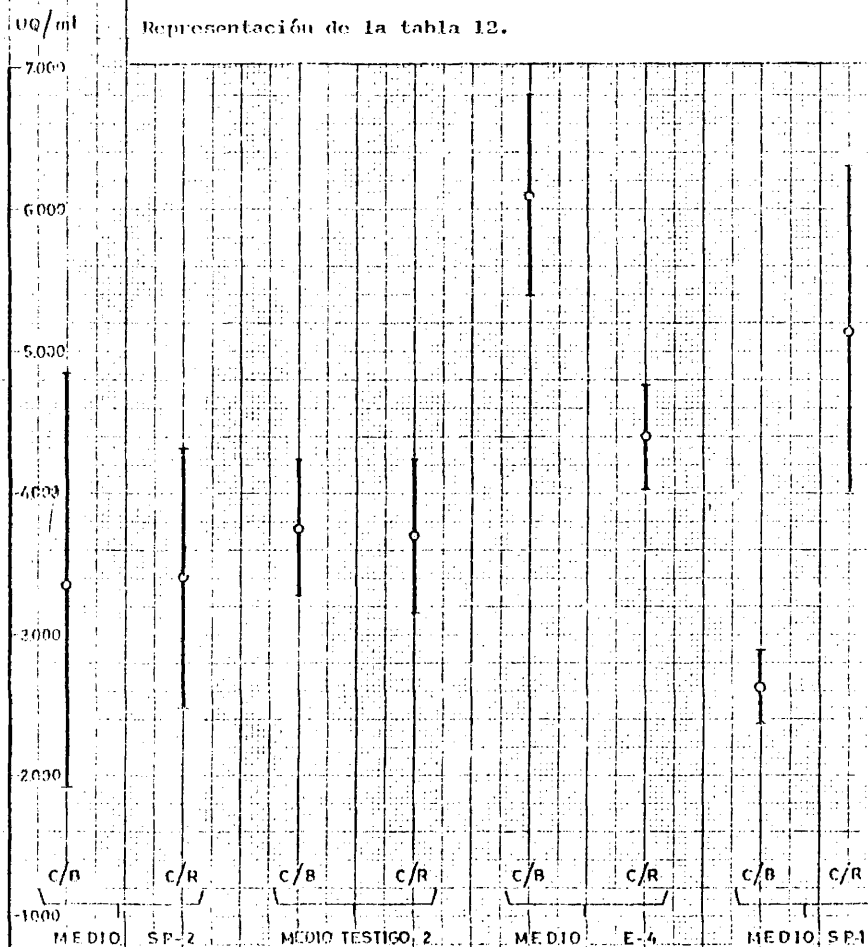
Selección de Medios de cultivo y colonias.

Medios: 2 (Testigo); SP/1; E-4 y SP/2.

Colonias: Blanca y Rosa.

Actividades Queratinolíticas.

Representación de la tabla 12.



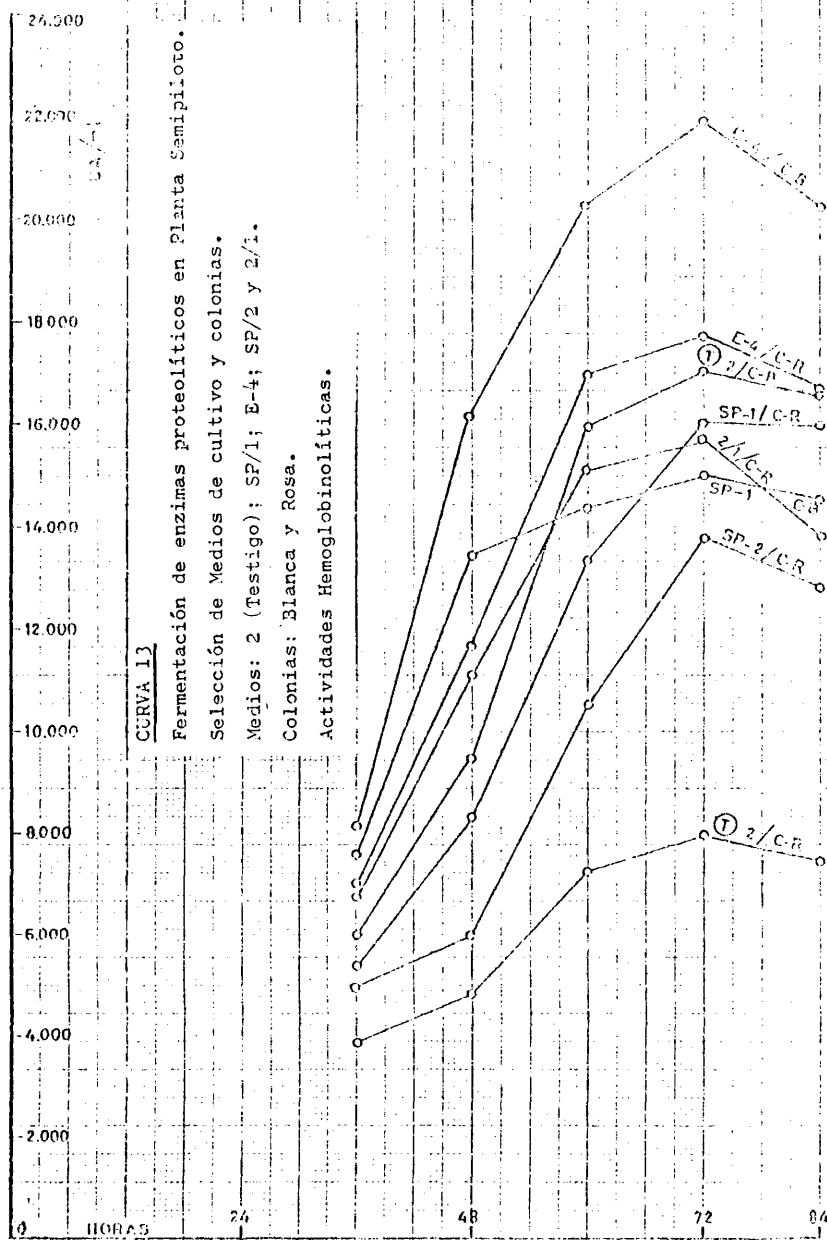


TABLA 13

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Semipiloto.

Selección de Medios de Cultivo y Colonias.

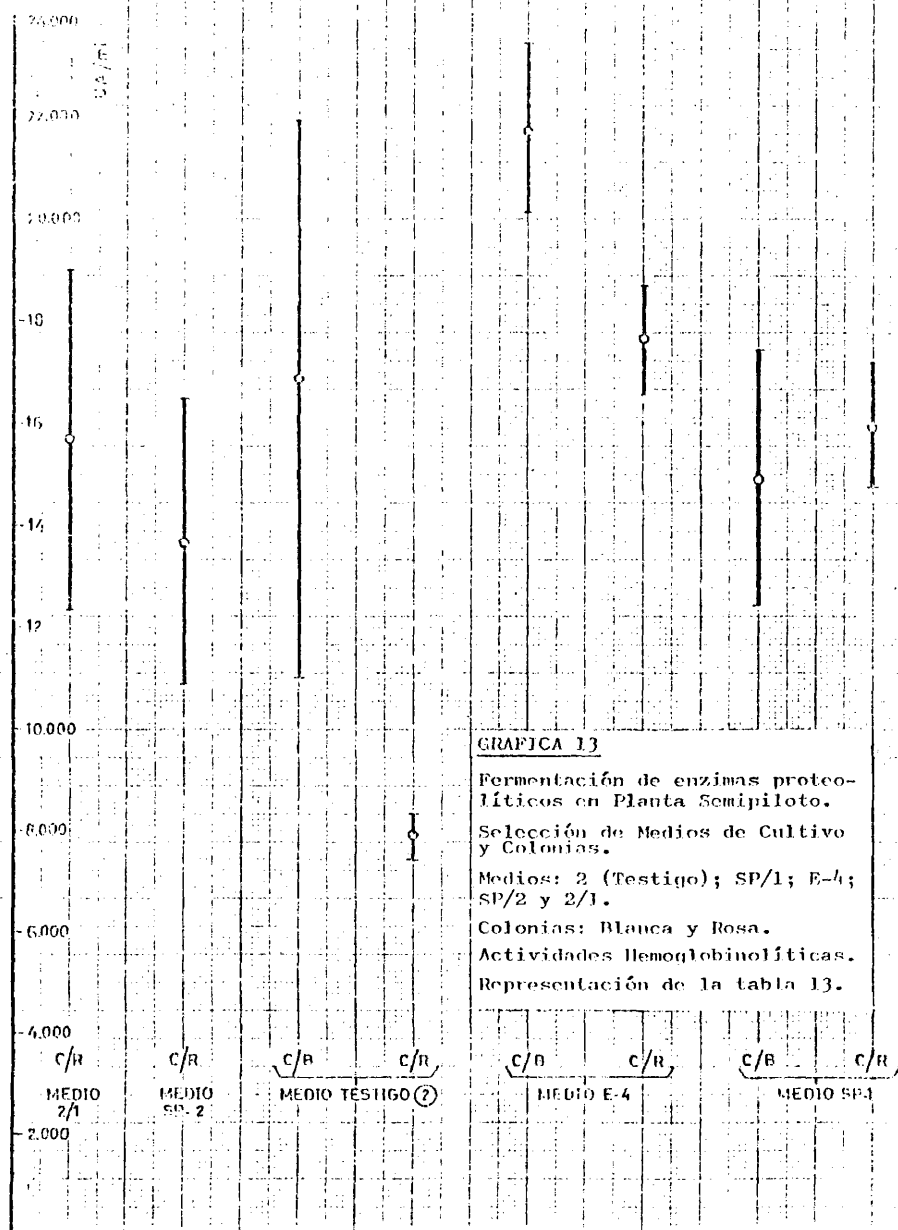
Medios: 2 (Testigo); SP/1; E-4; SP/2 y 2/1.

Colonias: Blanca y Rosa.

Actividades Hemoglobinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | dsx | I.V.% |
|-------------------|-----------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------|-------|
| Medio 2 | col. B | 5 | 11.049 | 16.978 | 22.907 | 2.135 | 28 |
| | Testigo col. R. | 10 | 7.513 | 7.959 | 8.405 | 197 | 7 |
| Medio SP/1 | col. B. | 4 | 12.436 | 14.967 | 17.497 | 795 | 10 |
| | col. R. | 12 | 14.798 | 15.988 | 17.178 | 540 | 11 |
| Medio E-4 | col. B. | 29 | 20.150 | 21.778 | 23.406 | 794 | 19 |
| | col. R. | 42 | 16.532 | 17.629 | 18.725 | 542 | 19 |
| Medio SP/2 | col. B. | - | - | - | - | - | - |
| | col. R. | 11 | 10.815 | 13.714 | 16.613 | 1.301 | 31 |
| Medio 2/1 | col. B. | - | - | - | - | - | - |
| | col. R. | 9 | 12.164 | 15.656 | 19.147 | 1.514 | 29 |



FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN
PLANTA PILOTO

Pruebas con el medio E-4, (Testigo)

En la curva 14/15, se puede ver la evolución de la fermentación, cuando se emplea el medio E-4, que fué seleccionado como el mejor junto con las condiciones de fermentación y colonias, en la planta semipiloto.

La actividad queratinolítica tiene su valor máximo a las 66 horas, con una actividad de 4.721 UQ/ml. Se vió que, a partir de las 66 horas, el valor de la actividad practicamente se estabiliza. La actividad hemoglobinolítica dá el máximo a las 66 horas de proceso, con un valor de 16.535 UA/ml.. Claramente se observa que es durante el período entre las 36-66 horas cuando se incrementa rápidamente esta actividad.

El pH del caldo de fermentación inicial era de 7,2; a las 24 horas, el valor del pH había disminuído a 5,5 pero aumenta a

partir de este momento. El valor final a las 72 horas, fué de 8,5.

Se vé asimismo en las valoraciones efectuadas a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas, que el consumo de azúcar se ha producido de manera rápida de las 0 a las 36 horas, quedando a las 48 horas, cantidades prácticamente nulas.

En las tablas 14 y 15 se expresan los datos estadísticos obtenidos.

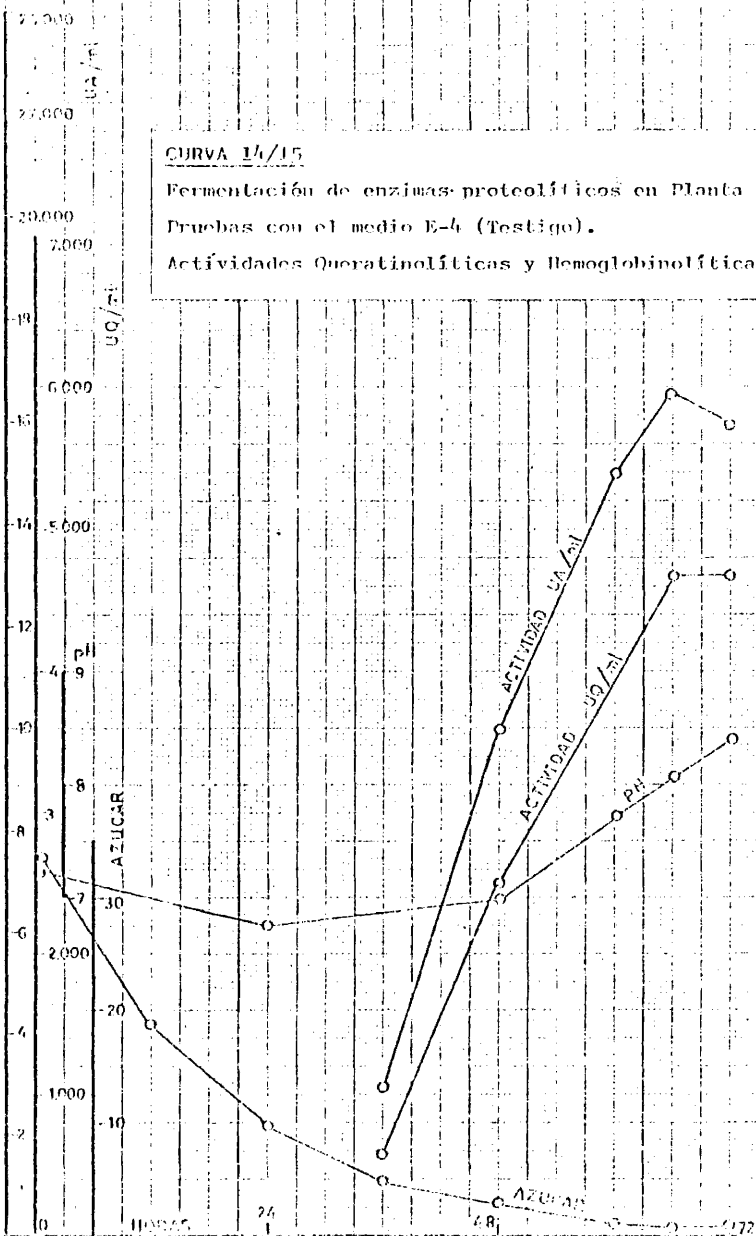


TABLA 14

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.

Pruebas con el medio E-4 (Testigo)

Actividades Queratinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V.% |
|--|----|---------------|-----------|---------------|-------------|-------|
| Fermentaciones Planta Piloto Medio E-4 | 10 | 3.822 | 4.721 | 5.621 | 397 | 26 |

TABLA 15

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.

Pruebas con el medio E-4 (Testigo)

Actividades Hemoglobinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|--|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| Fermentaciones Planta Piloto Medio E-4 | 10 | 15.072 | 16.535 | 17.998 | 646 | 12 |

FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN

PLANTA PILOTO.

Efecto de la aireación en la fermentación.

Fermentaciones 0,5 litros/litro/minuto; 0,75 l/l/m.;

1,0 l/l/m. de caudal de aire.

Al igual que se hizo en la Planta Semipiloto, en la Planta Piloto se realizaron pruebas con diferentes caudales de aire con el fin de conseguir aumentar aún más las actividades.

En la curva 16, se representa la evolución seguida durante el proceso por la actividad queratinolítica, cuando se le suministraban a la fermentación caudales de aire de 0,5 l/l/m.; 0,75 l/l/m. y 1,0 l/l/m.

La máxima actividad queratinolítica 6.738 UQ/ml., se obtuvo con el caudal de aire de 1,0 l/l/m. y a las 66 horas de proceso.

En esta misma curva podemos observar la evolución del pH. durante la fermentación. El pH. inicial es de 7,2-7,3; transcurri-

das las 12 primeras horas del proceso ha disminuído en las tres pruebas de aireación, para comenzar a aumentar a partir de estas 12 horas de forma muy semejante con los tres caudales de aire de la prueba; - los máximos valores se obtienen a las 66 horas de proceso siendo éstos de 9,0, 8,5 y 9,3 para los caudales de 0,5 l/l/m.; 0,75 l/l/m. y 1,0 l/l/m. respectivamente.

En la curva 17 se vé la evolución seguida por la actividad hemoglobínolítica, obteniéndose también en este caso el máximo valor cuando suministramos 1,0 l/l/m. y a las 66 horas de proceso.

En esta curva 17, vemos el curso seguido por el consumo de azúcar en la fermentación. Este consumo es mucho más rápido cuanto mayor es el caudal de aire suministrado, hasta llegar a las 72 horas de proceso, en que los niveles de azúcar son de 5,0 mg/ml. ; 1,8 mg/ml. y 0,3 mg/ml. con 0,5 l/l/m.; 0,75 l/l/m. y 1,0 l/l/m. respectivamente.

En las tablas 16 y 17 se expresan los datos estadísticos de las pruebas de actividad queratinolítica y hemoglobínolítica, realizadas con diferentes caudales de aire.

En las gráficas 16 y 17, se representan los valores promedios y márgenes de confianza de ambas actividades.

CURVA 16

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.

Efecto de la aireación en la fermentación.

Fermentaciones con 0,5 litros/litro/minuto; 0,75 l/l/m; y 1,0 l/l/m. de caudal de aire.

Actividades Queratinolíticas.

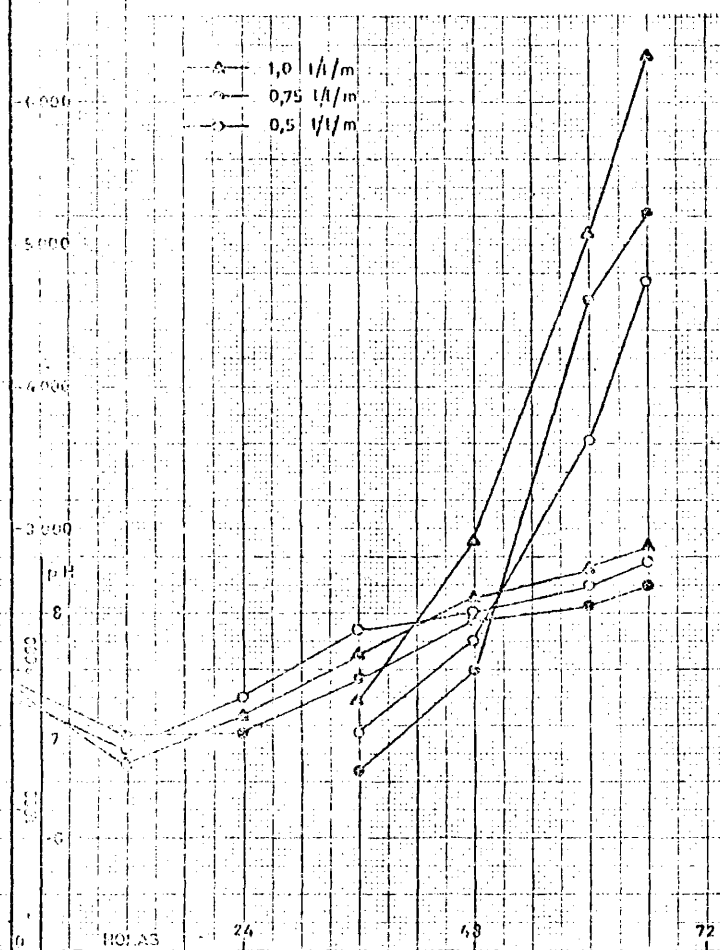


TABLA 16

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.

Efecto de la aireación en la fermentación.

Fermentaciones con 0,5 litros/litro/minuto; 0,75 l/l/m; y 1,0 l/l/m.
de caudal de aire.

Actividades Queratinolíticas.

Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|-------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| 0,5 l/l/m. | 5 | 3.986 | 4.759 | 5.531 | 278 | 13 |
| 0,75 l/l/m. | 9 | 4.330 | 5.233 | 6.136 | 391 | 22 |
| 1,0 l/l/m. | 11 | 5.227 | 6.378 | 7.528 | 516 | 26 |

no/mi

7000

6000

5000

4000

3000

2000

1000

GRAFICA 16

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.

Efecto de la aireación en la fermentación.

Fermentaciones con 0,5 litros/litro/minuto; 0,75 l/l/m. y 1,0 l/l/m. de caudal de aire.

Actividades Queratinolíticas.

Representación de la tabla 16.

0,5 l/l/m

0,75 l/l/m

1 l/l/m

221

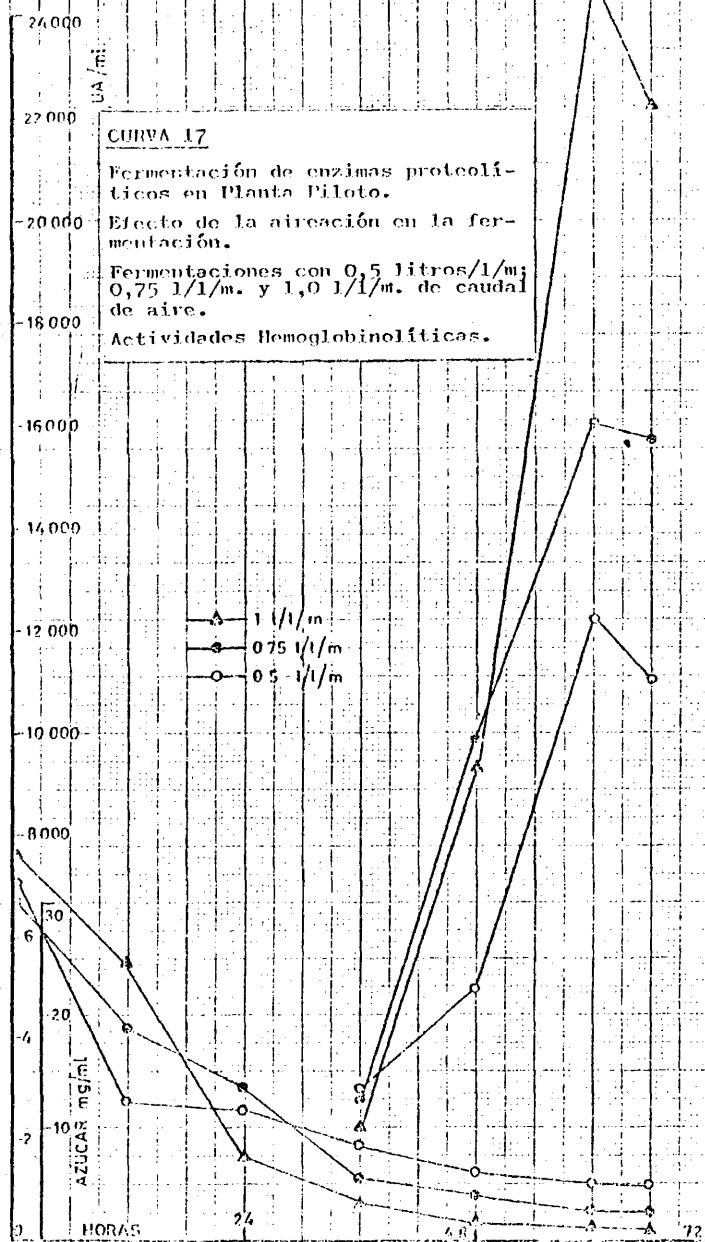


TABLA 17

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.

Efecto de la aireación en la fermentación.

Fermentaciones con 0,5 litros/litro/minuto; 0,75 l/l/m.; y 1,0 l/l/m.
de caudal de aire.

Actividades Hemoglobinolíticas.

Datos estadísticos.

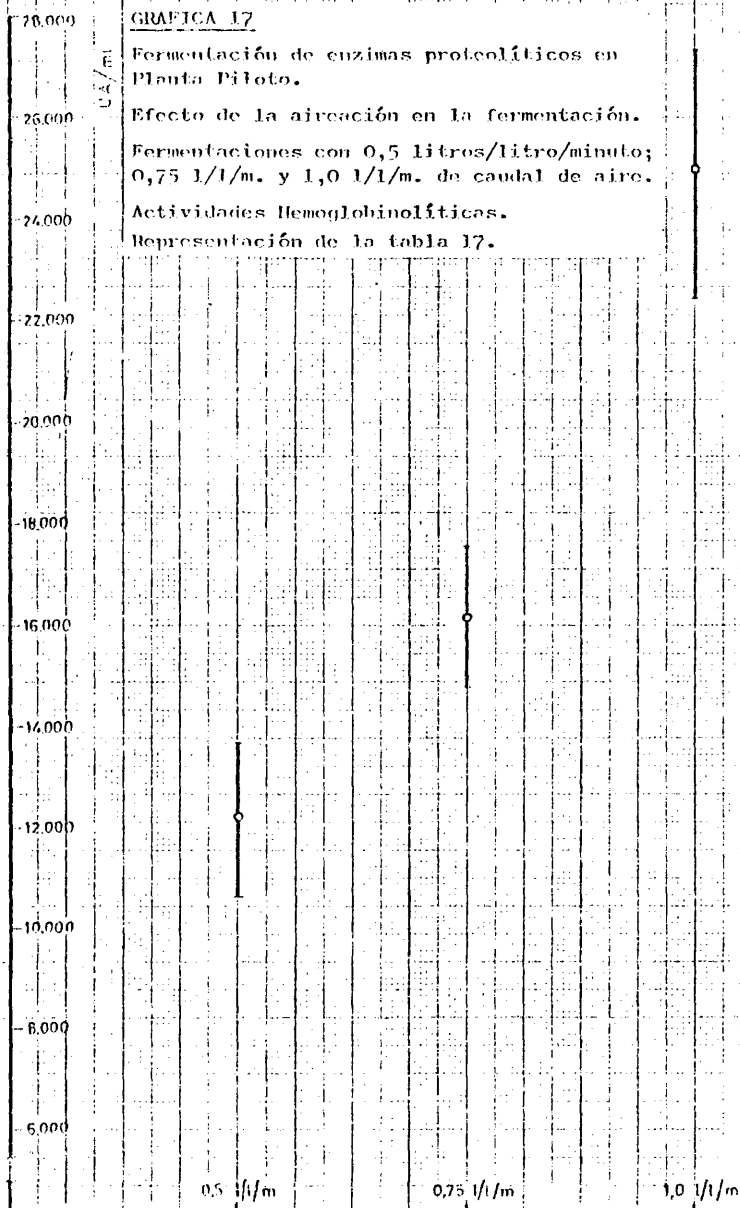
| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|-------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| 0,5 l/l/m. | 14 | 10.640 | 12.234 | 13.828 | 737 | 22 |
| 0,75 l/l/m. | 11 | 14.614 | 16.151 | 17.688 | 690 | 14 |
| 1,0 l/l/m. | 11 | 22.397 | 24.906 | 27.414 | 1.125 | 14 |

GRAFICA 17

Fermentación de enzimas proteolíticos en
Planta Piloto.

Efecto de la aireación en la fermentación.
Fermentaciones con 0,5 litros/litro/minuto;
0,75 l/l/m. y 1,0 l/l/m. de caudal de aire.

Actividades Hemoglobinolíticas.
Representación de la tabla 17.



FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN
PLANTA PILOTO.

Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.

Medios E-4 (Testigo); E-4/1; E-4/2 y E-4/3.

Una vez seleccionado el medio E-4, por ser con el que se han obtenido las mayores actividades, pensamos en hacer fermentaciones con nuevas y diferentes adiciones.

La primera prueba efectuada fué adicionar 2,5 g/l. de soja, polvo de pezuña y corn-steep, a las 24 horas del proceso y otros 2,5 g/l. a las 36 horas. Al medio resultante lo llamamos E-4/1 y la actividad queratinolítica que obtuvimos con él, fué de 5.804 UQ/ml. - frente a 6.878 UQ/ml. con el medio testigo. La actividad hemoglobiolítica fué de 18.287 UA/ml. frente a 25.276 UA/ml. del medio testigo, E-4.

En la segunda prueba efectuada, medio E-4/2, las adiciones fueron de 5 g/l. de soja y 2,5 g/l. de polvo de pezuña a las -

24 horas de fermentación y de 5 g/l. de soja y 2,5 g/l. de polvo de pezuña a las 36 horas de proceso. Los caldos de fermentación dieron unas actividades queratinolítica y hemoglobinolítica de 5.573 UQ/ml. y 15.528 UA/ml. respectivamente. Podemos ver que en ambos casos las actividades alcanzadas son menores que las obtenidas con el medio testigo.

En la tercera prueba pusimos Dextrosa en la carga inicial en lugar de almidón para el medio E-4 y también en este caso las actividades obtenidas, tanto queratinolítica como hemoglobinolítica - eran sensiblemente menores que las del medio testigo E-4.

Después de estas experiencias realizadas con adiciones de nutrientes durante la fermentación de Streptomyces fradiae - para la obtención de enzimas proteolíticos, podemos concluir que - por lo menos en las condiciones realizadas, estas adiciones no suponen una mejora en las actividades queratinolítica y hemoglobinolítica presentes en los caldos de fermentación.

CURVA 18

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.
 Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.
 Medios E-4 (Testigo); E-4/1; E-4/2 y E-4/3.
 Actividades Queratinolíticas.

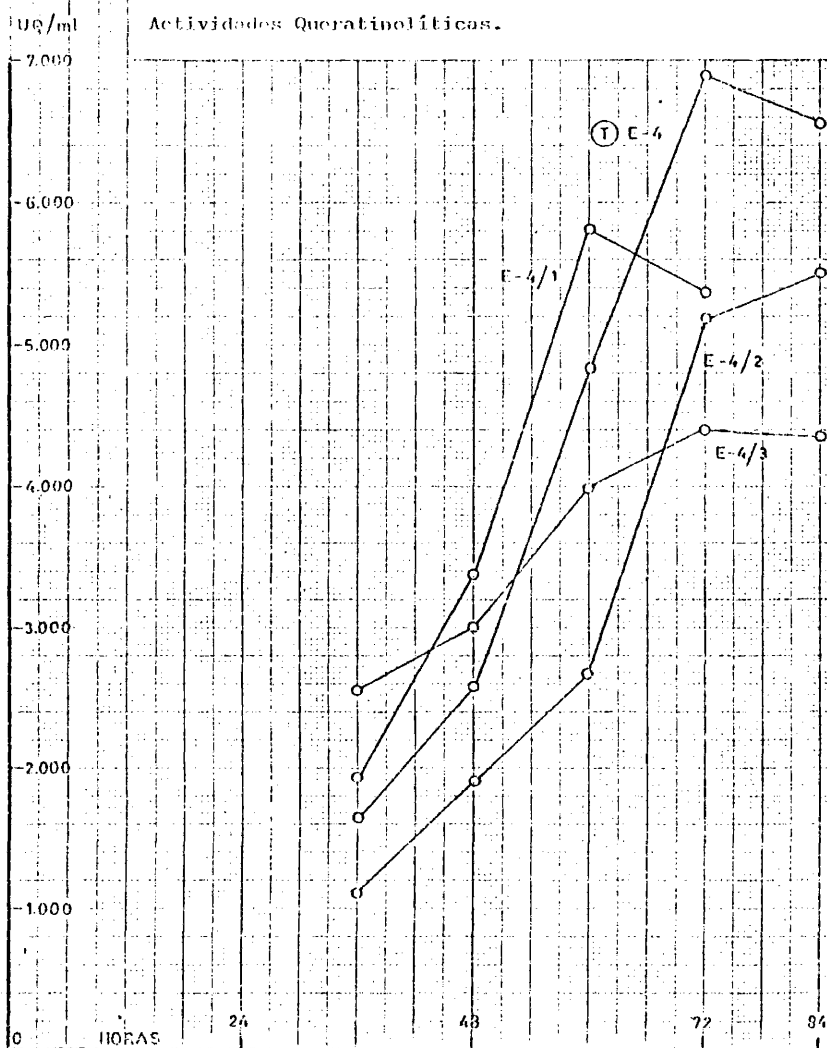


TABLA 18

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.
 Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.
 Medios E-4 (Testigo); E-4/1; E-4/2 y E-4/3.
 Actividades Queratinolíticas.
 Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V. % |
|-------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|--------|
| Medio Testigo E-4 | 10 | 6.045 | 6.878 | 7.711 | 368 | 16 |
| Medio E-4/1 | 10 | 5.103 | 5.804 | 6.504 | 309 | 16 |
| Medio E-4/2 | 10 | 4.949 | 5.573 | 6.200 | 277 | 15 |
| Medio E-4/3 | 11 | 3.437 | 4.415 | 5.393 | 308 | 21,6 |

UQ/ml

7.000

6.000

5.000

4.000

3.000

2.000

1.000

GRAFICA 18

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.

Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.

Medios E-4 (Testigo); E-4/1; E-4/2 y E-4/3.

Actividades Queratinolíticas.

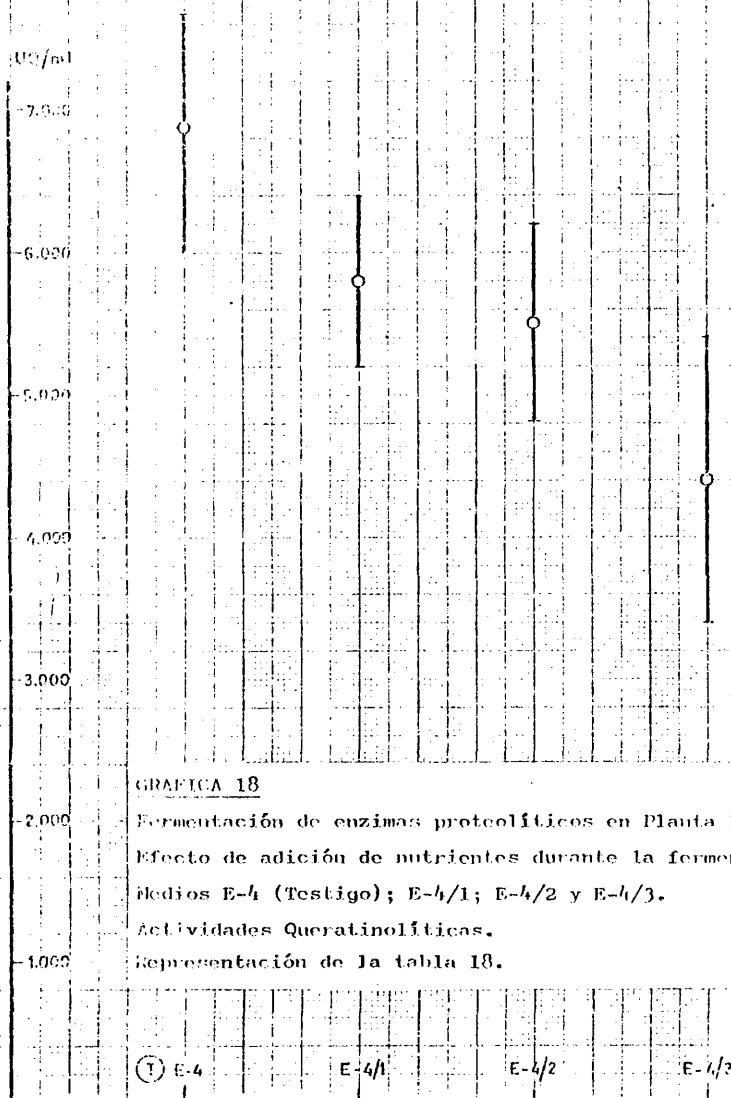
Representación de la tabla 18.

① E-4

E-4/1

E-4/2

E-4/3



CURVA 19

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.
 Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.
 Medios E-4 (Testigo); E-4/1; E-4/2 y E-4/3.
 Actividades Hemoglobinolíticas.

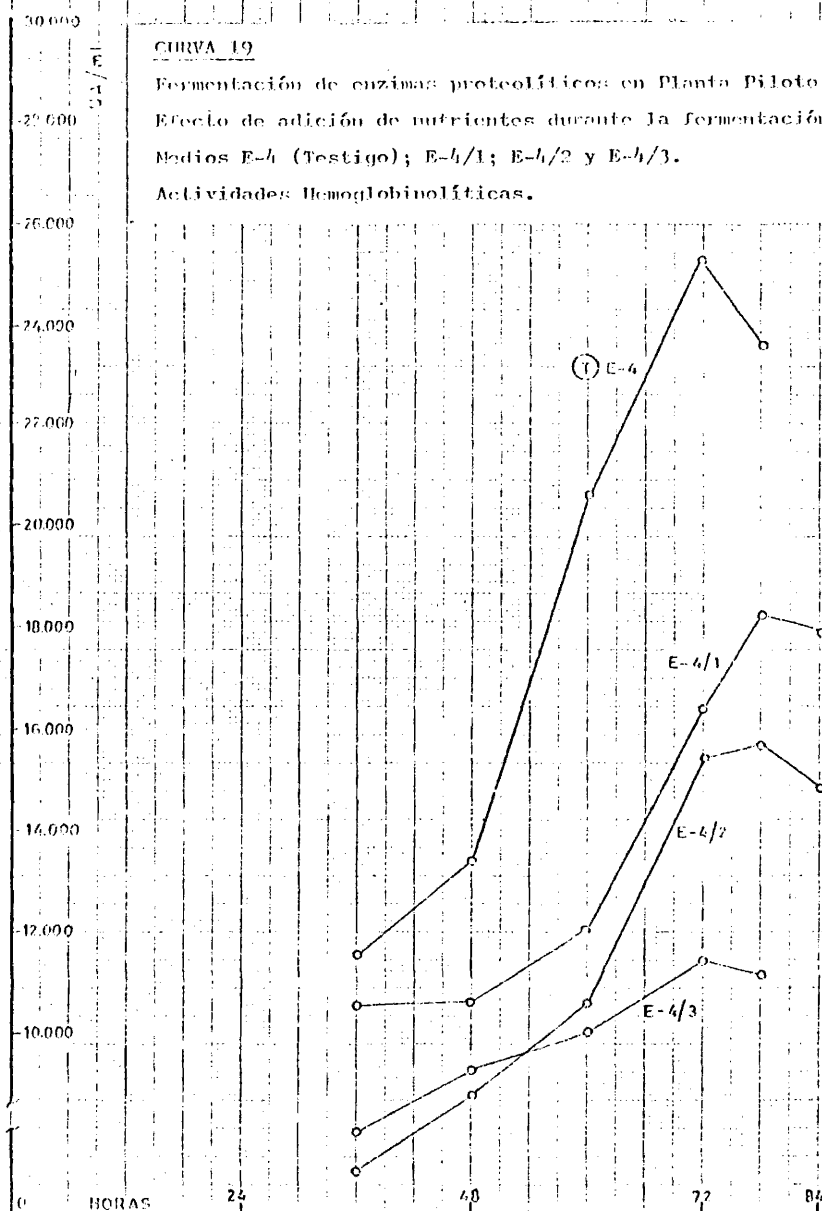


TABLA 19

Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.
 Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.
 Medios E-4 (Testigo); E-4/1; E-4/2 y E-4/3.
 Actividades Hemoglobinolíticas.
 Datos estadísticos.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V.% |
|-------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|-------|
| Medio Testigo E-4 | 10 | 23.411 | 25.276 | 27.141 | 824 | 10 |
| Medio E-4/1 | 10 | 17.101 | 18.287 | 19.472 | 524 | 9 |
| Medio E-4/2 | 10 | 14.407 | 15.528 | 16.650 | 495 | 10 |
| Medio E-4/3 | 11 | 10.465 | 11.477 | 12.488 | 453 | 13 |

GRAFICA 19

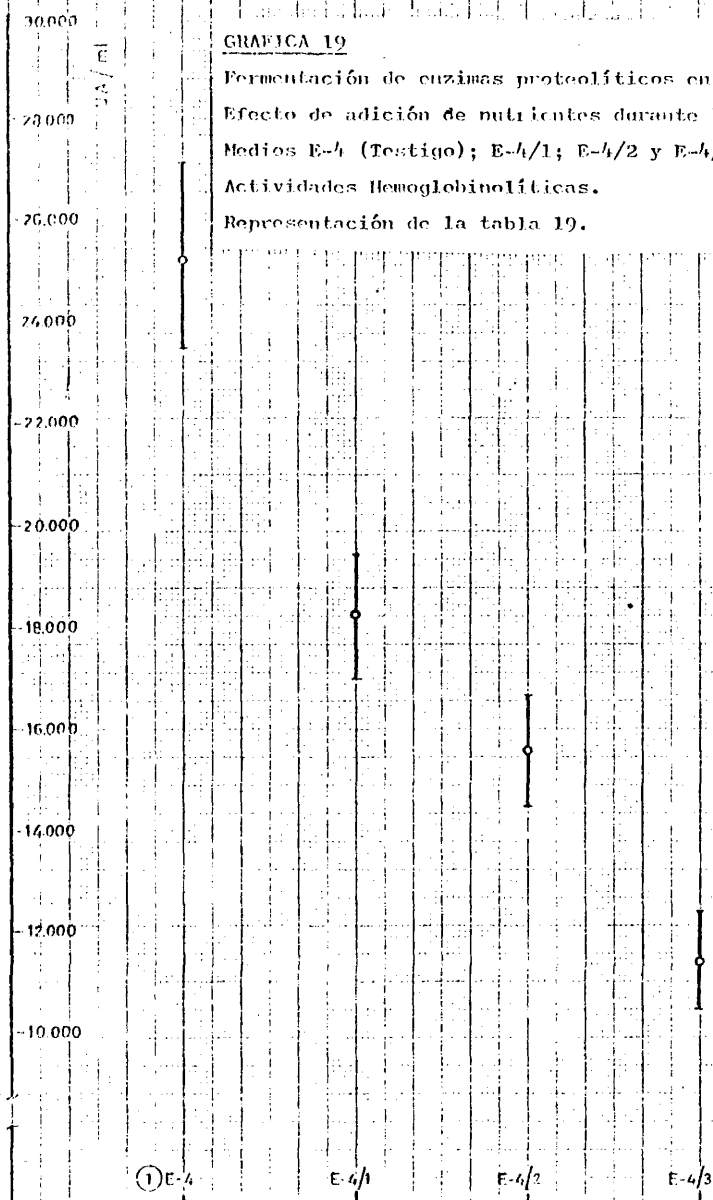
Fermentación de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.

Efecto de adición de nutrientes durante la fermentación.

Medios E-4 (Testigo); E-4/1; E-4/2 y E-4/3.

Actividades Hemoglobínicas.

Representación de la tabla 19.



FERMENTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN PLAN-
TAS PILOTO E INDUSTRIAL.

Comparación de las fermentaciones en ambas plantas.

Medio E-4.

Al comparar las actividades promedio queratinolíticas y hemoglobinolíticas, obtenidas respectivamente en las fermentaciones de Planta piloto y fábrica, se vé que no existen diferencias significativas en los resultados.

Los valores promedio de actividad queratinolítica a las 66 horas, son algo más elevados en la Planta piloto que los obtenidos en fábrica. Tanto en Planta piloto como en fábrica se produce una rápida subida de las actividades entre las 48 y 60 horas de proceso, curva 20.

Análogamente se comportan las actividades hemoglobinolíticas, ya que las fermentaciones en ambas plantas siguen caminos muy paralelos. Los valores máximos de actividad se obtuvieron a las

66 horas en la Planta piloto y a las 72 horas en fábrica; dichos valores fueron respectivamente de 28.526 y 25.833 UA/ml., curva 21.

La evolución del pH en ambos procesos, Planta piloto y fábrica, se puede seguir en dichas curvas. Como es habitual en esta fermentación se produce una bajada sobre el valor inicial del pH, sobre las 24 horas, para incrementarse posteriormente hasta unos valores de aproximadamente 8,5 en fábrica y 8,7 en Planta piloto. Como se puede apreciar, la marcha del pH sigue prácticamente la misma evolución en las dos curvas.

El consumo de azúcar es también muy parecido, aunque al final del proceso se tengan unos valores ligeramente superiores en las fermentaciones de fábrica.

23h

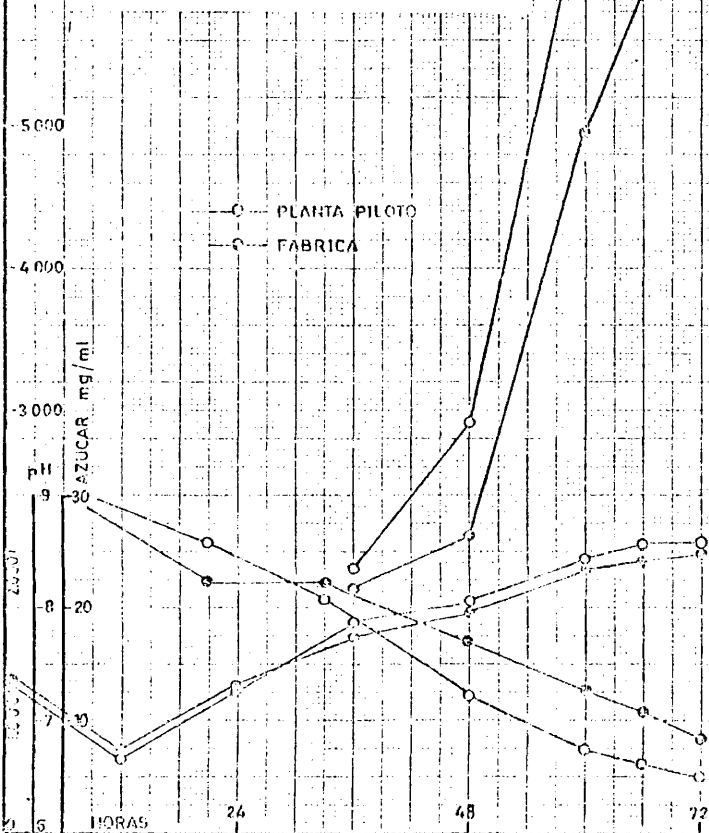
UO/ml

CURVA 20

Fermentación de enzimas proteolíticos en las P. Piloto e Industr.
Comparación de las fermentaciones en ambas plantas.

Medio E-4.

Actividades Queratinolíticas.



235

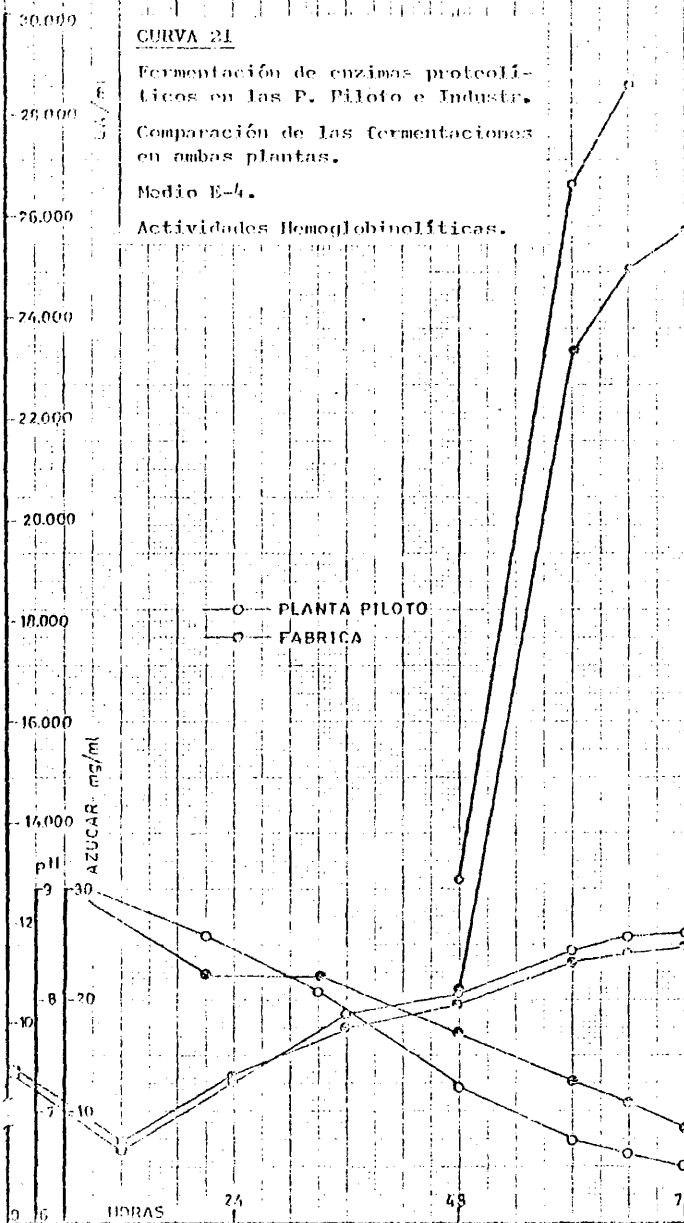


TABLA 20-21

Fermentación de enzimas proteolíticos en las Plantas Piloto e Industrial.

Comparación de las fermentaciones en ambas plantas.

Medio E-4.

Datos estadísticos.

Actividades Queratinolíticas.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V.% |
|---------------------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|-------|
| Fermentaciones Planta Piloto | 30 | 6.764 | 7.704 | 8.644 | 459 | 33 |
| Fermentaciones Fábrica | 29 | 6.233 | 6.768 | 7.302 | 261 | 20 |

Actividades Hemoglobinolíticas.

| Variable | n | $\bar{x}-tds$ | \bar{x} | $\bar{x}+tds$ | $ds\bar{x}$ | I.V.% |
|---------------------------------|----|---------------|-----------|---------------|-------------|-------|
| Fermentaciones Planta Piloto | 31 | 27.778 | 28.528 | 29.268 | 362 | 7 |
| Fermentaciones Fábrica | 31 | 25.378 | 25.833 | 26.289 | 223 | 5 |

237

uc/ml

8.000

3.000

2.000

6.000

5.000

4.000

3.000

GRAFICA 20

Fermentación de enzimas proteolíticos en las Plantas Piloto e Industrial.

Comparación de las fermentaciones en ambas plantas.

Medio E-4.

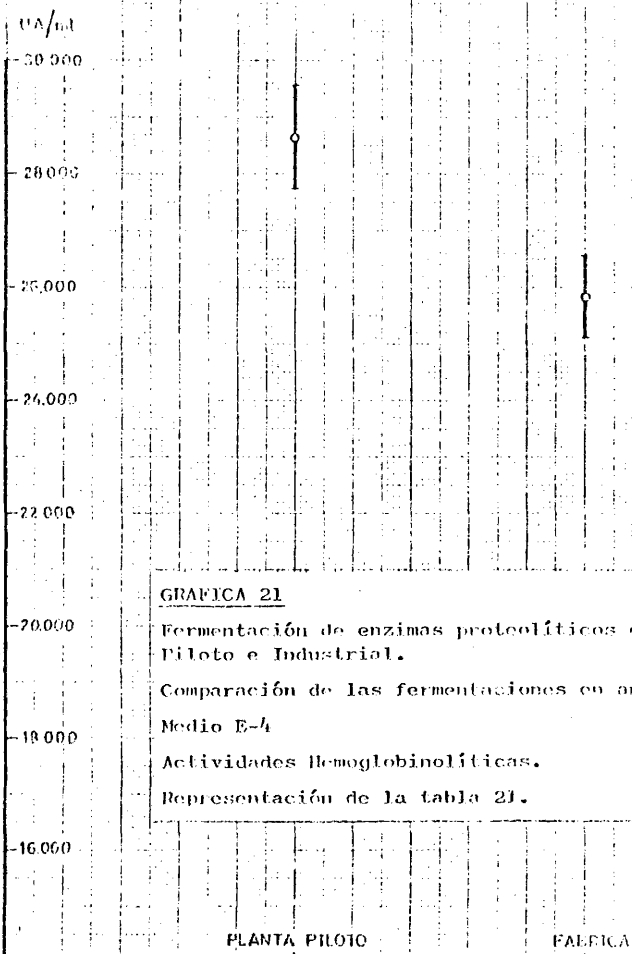
Actividades Queratinolíticas.

Representación de la tabla 20.

PLANTA PILOTO

FABRICA

238



GRAFICA 21
 Fermentación de enzimas proteolíticos en las Plantas
 Piloto e Industrial.
 Comparación de las fermentaciones en ambas plantas.
 Medio E-4
 Actividades Hemoglobinolíticas.
 Representación de la tabla 21.

EXTRACCION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS ENLABORATORIO

Extracción de caldos de Planta Semipiloto.

En la tabla (22) se expresan los datos obtenidos, promedio de las 7 pruebas de extracción realizadas con el proceso standard.

Este proceso, es el ya descrito en el apartado correspondiente, 3.4.2.

Se partió de una mezcla de caldos fermentados con 7.380 UA/ml. y 2.610 UQ/ml. de actividad promedio; después de la filtración, el volumen a extraer era de 3.000 ml. con una actividad de 7.115 UA/ml. y de 2.480 UQ/ml. del caldo mezclado.

A partir del caldo filtrado se obtuvieron 15,07 g. de proteasa cruda con una actividad hemoglobinolítica de 680 UA/mg. y 243 UQ/mg. queratinolítica. Este enzima crudo se purificó, y se obtuvieron 7,29 g. de proteasa con una actividad de 1.167 UA/mg. y 479 UQ/mg.

El rendimiento de la extracción del caldo filtrado a proteasa cruda, fué del 48% sobre la actividad hemoglobinolítica y del 49% sobre la actividad queratinolítica y del 40% y 47% con respecto a proteasa purificada.

El rendimiento de proteasa cruda a proteasa más purificada fué en actividad hemoglobinolítica y queratinolítica del 83% y 95% respectivamente.

TABLA 22

Extracción de enzimas proteolíticos en Laboratorio.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto.

Proceso Standard. (pág. 91 - 94)

| Fermentación en Planta Semipiloto | Actividades hemoglobinolíticas | Actividades queratinolíticas |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|
| Actividad del caldo fermentado. | 7.380 UA/ml. | 2.610 UQ/ml. |
| Volumen de caldo filtrado, ml. | 3.000 | 3.000 |
| Actividad promedio caldo filtrado. | 7.115 UA/ml. | 2.480 UQ/ml. |
| Peso proteasa cruda obtenida g. | 15,07 | 15,07 |
| Actividad proteasa cruda | 680 UA/mg. | 243 UQ/mg. |
| Peso proteasa pura obtenida g. | 7,29 | 7,29 |
| Actividad proteasa pura | 1.167 UA/mg. | 479 UQ/mg. |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa cruda | 48% | 49% |
| Rendimiento %, proteasa cruda/ proteasa pura | 83% | 95% |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa pura | 40% | 47% |

EXTRACCION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN
LABORATORIO.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, fermentados con diferentes caudales de aire.

En las tablas 23 y 24 se exponen los diferentes valores de actividades queratinolítica y hemoglobinolítica obtenidos en la extracción de los caldos fermentados con diferentes caudales de aire; - 0,5 l/l/m.; 0,75 l/l/m. y 1,0 l/l/m., frente a un mismo volumen de caldo filtrado de 3.000 ml. El número de pruebas de cada variable ha sido de 5 y estas tablas expresan los valores promedios.

Los pesos de proteasa cruda y purificada obtenidos con los caldos con caudal de aire de 0,5 l/l/m. fueron los mayores.

Las actividades mayores de proteasa cruda y purificada proceden de los caldos fermentados con 1,0 l/l/m. de aireación, por lo que se puede afirmar que es ésta la aireación más conveniente.

Los rendimientos, de actividad hemoglobinolítica, so--

bre el proceso standard en el caso de un caudal de aire de 0,5 l/l/m. son del 97% y de un 193% y 232% cuando el caudal es de 0,75 l/l/m. y 1,0 l/l/m. respectivamente.

En actividad queratinolítica, y sobre el proceso standard, son del 74%, 141% y 192% para los caudales de aire de 0,5 l/l/m. 0,75 l/l/m. y 1,0 l/l/m. respectivamente.

TABLA 23

Extracción de enzimas proteolíticos en Laboratorio.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, fermentados con diferentes caudales de aire.

Actividades Queratinolíticas.

| Caudal de aireación durante la fermentación | 0,5 l./l./m. | 0,75 l./l./m. | 1,0 l./l./m. |
|---|--------------|---------------|--------------|
| Actividad del caldo fermentado, UQ/ml. | 3.020 | 4.468 | 4.594 |
| Volumen de caldo filtrado, ml. | 3.000 | 3.000 | 3.000 |
| Actividad promedio caldo filtrado, UQ/ml. | 2.912 | 4.113 | 4.477 |
| Peso proteasa cruda obtenida g. | 13,10 | 9,03 | 7,20 |
| Actividad proteasa cruda, UQ/mg. | 353 | 328 | 410 |
| Peso proteasa pura obtenida g. | 6,30 | 3,81 | 2,89 |
| Actividad proteasa pura, UQ/mg. | 551 | 676 | 920 |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa cruda | 53% | 24% | 22% |
| Rendimiento %, proteasa cruda/ proteasa pura | 75% | 87% | 90% |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa pura | 40% | 21% | 20% |

TABLA 24

Extracción de enzimas proteolíticos en Laboratorio.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, fermentados con diferentes caudales de aire.

Actividades Hemoglobinolíticas.

| Caudal de aireación durante la fermentación | 0,5 l./l./m. | 0,75 l./l./m. | 1,0 l./l./m. |
|---|--------------|---------------|--------------|
| Actividad del caldo fermentado, UA/ml. | 6.347 | 8.970 | 9.315 |
| Volumen de caldo filtrado, ml. | 3.000 | 3.000 | 3.000 |
| Actividad promedio caldo filtrado, UA/ml. | 6.181 | 8.799 | 9.000 |
| Peso proteasa cruda obtenida g. | 13,10 | 9,03 | 7,20 |
| Actividad proteasa cruda, UA/mg. | 764 | 1.096 | 1.334 |
| Peso proteasa pura obtenida g. | 6,30 | 3,81 | 2,89 |
| Actividad proteasa pura, UA/mg. | 1.130 | 2.260 | 2.710 |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa cruda | 54% | 37% | 36% |
| Rendimiento %, proteasa cruda/ proteasa pura | 71% | 87% | 82% |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa pura | 38% | 33% | 29% |

EXTRACCION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN
LABORATORIO

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, fermentados con diferentes medios de cultivo.

En las tablas 25 y 26, se exponen los diferentes valores de actividades queratinolítica y hemoglobinolítica obtenidos en la extracción de caldos fermentados según los medios de cultivo ensayados.

Los caldos fermentados se filtraron y, como en todas las pruebas hechas con cada variable, se separaron 3.000 ml. de caldo filtrado. El número de pruebas efectuadas es de 6 para cada medio y en la tabla están los valores promedios.

El caldo del medio Testigo tiene la máxima actividad en ambas valoraciones hemoglobinolítica y queratinolítica, y también en los filtrados.

El peso de proteasa cruda es sin embargo mayor para el medio QS-6/2, que el del medio testigo, QS-6.

Las dos actividades son también más elevadas en los caldos procedentes del medio testigo.

Las variaciones en las actividades entre el proceso estándar y las pruebas con caldos y distintas adiciones han sido para la actividad hemoglobinolítica de un 191% en el medio testigo; 101% para el medio 1; 93% para el medio 2, y 140% para el 3. En la actividad queratinolítica, del 152%, 62%, 72% y 123% en los medios testigo; 1 2 y 3 respectivamente.

Como se vé las distintas adiciones efectuadas no han supuesto un aumento en las actividades.

TABLA 25

Extracción de enzimas proteolíticos en Laboratorio.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto fermentados con diferentes - medios que lleven adición de nutrientes.

Actividades Queratinolíticas.

| Caldos fermentados en Planta Semipiloto | Medio Testigo QS-6 | Medio QS-6/1 | Medio QS-6/2 | Medio QS-6/3 |
|---|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| Actividad caldo fermentado, UQ/ml. | 5.410 | 3.650 | 3.940 | 5.220 |
| Volumen de caldo filtrado, ml. | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 |
| Actividad caldo filtrado, UQ/ml. | 5.270 | 3.587 | 3.811 | 5.185 |
| Peso proteasa cruda, g. | 25,57 | 26,32 | 37,19 | 23,5 |
| Actividad proteasa cruda, UQ/mg. | 364 | 163 | 86 | 291 |
| Peso proteasa pura, g. | 11,75 | 12,15 | 7,02 | 10,42 |
| Actividad proteasa pura, UQ/mg. | 730 | 301 | 346 | 591 |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa cruda | 59% | 40% | 28% | 44% |
| Rendimiento %, proteasa cruda/ proteasa pura | 92% | 85% | 76% | 90% |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa pura | 54% | 34% | 21% | 40% |

TABLA 26

Extracción de enzimas proteolíticos en Laboratorio.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, fermentados con diferentes medios que llevan adición de nutrientes.

Actividades Hemoglobinolíticas.

| Caldos fermentados en Planta Semipiloto | Medio Testigo QS-6 | Medio QS-6/1 | Medio QS-6/2 | Medio QS-6/3 |
|---|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| Actividad del caldo fermentado, UA/ml. | 15.320 | 9.835 | 8.560 | 13.175 |
| Volumen de caldo filtrado, ml. | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 |
| Actividad caldo filtrado, UA/ml. | 15.120 | 9.360 | 7.460 | 12.747 |
| Peso proteasa cruda obtenida g. | 25,27 | 26,32 | 37,19 | 23,5 |
| Actividad proteasa cruda, UA/mg. | 1.117 | 717 | 676 | 1.115 |
| Peso proteasa pura obtenida g. | 11,75 | 12,15 | 7,02 | 10,42 |
| Actividad proteasa pura, UA/mg. | 2.334 | 1.190 | 1.085 | 1.640 |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa cruda | 63% | 92% | 85% | 71% |
| Rendimiento %, proteasa cruda/ proteasa pura | 96% | 56% | 40% | 63% |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa pura | 60% | 51% | 34% | 45% |

EXTRACCION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN
LABORATORIO.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto cosechados
con distintos pH finales.

Los valores de las actividades queratinolítica y hemoglobinolítica obtenidos en la extracción de los caldos fermentados con diferentes pH se expresan de las tablas 27 y 28.

El número de pruebas efectuadas con cada grupo de pH
fué de 8 y las tablas presentan valores promedios de ellas.

Trabajamos con un volumen de 3.000 ml. de caldo filtrado.

Se ha comprobado que los caldos filtrados con mayor actividad queratinolítica y hemoglobinolítica, tienen un pH comprendido entre 7,5 - 8,4. Además las actividades de proteasa cruda purificada más elevadas proceden de caldos fermentados con un pH entre 7,5 - 8,4.

Por lo tanto se puede afirmar que los productos obtenidos de caldos de fermentación con pH entre 7,5 - 8,4, son los de mayor actividad. Asimismo los mayores rendimientos sobre el proceso estándar tanto para la actividad hemoglobínolítica como para la queratínolítica, se obtienen también con caldos fermentados a este mismo pH.

TABLA 27

Extracción de enzimas proteolíticos en Laboratorio.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, cosechados con distintos - pH finales.

Actividades Queratinolíticas.

| Caldos fermentados en Planta Semipiloto | pH hasta 7,4 | pH de 7,5-8,4 | pH de 8,5-9,0 | pH Sup. a 9,1 |
|---|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Actividad caldo fermentado, UQ/ml. | 4.017 | 4.689 | 3.473 | 2.836 |
| Volumen caldo filtrado, ml. | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 |
| Actividad promedio caldo filtrado, UQ/ml. | 3.980 | 4.479 | 3.385 | 2.715 |
| Peso proteasa cruda obtenida g. | 22,09 | 28,84 | 36,84 | 34,88 |
| Actividad proteasa cruda, UQ/mg. | 289 | 317 | 212 | 161 |
| Peso proteasa pura obtenida g. | 11,30 | 8,93 | 15,57 | 12,56 |
| Actividad proteasa pura, UQ/mg. | 497 | 725 | 497 | 433 |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa cruda | 53% | 68% | 77% | 69% |
| Rendimiento %, proteasa cruda/ proteasa pura | 88% | 71% | 99% | 97% |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa pura | 47% | 48% | 76% | 66% |

TABLA 28

Extracción de enzimas proteolíticos en Laboratorio.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, cosechados con distintos pH finales.

Actividades Hemoglobinolíticas.

| Caldos fermentados en Planta Semipiloto | pH hasta 7,4 | pH de 7,5-8,4 | pH de 8,5-9,0 | pH Sup. a 9,1 |
|--|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| Actividad del caldo fermentado, UA/ml. | 12.520 | 16.635 | 10.317 | 6.398 |
| Volumen de caldo filtrado, ml. | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 |
| Actividad promedio caldo filtrado, UA/ml. | 12.381 | 16.005 | 10.287 | 6.232 |
| Peso proteasa cruda obtenida g. | 22,09 | 28,84 | 36,84 | 34,88 |
| Actividad proteasa cruda, UA/mg. | 908 | 1.066 | 603 | 477 |
| Peso proteasa pura obtenida g. | 11,30 | 8,93 | 15,57 | 12,56 |
| Actividad proteasa pura, UA/mg. | 1.722 | 2.167 | 1.170 | 742 |
| Rendimiento %, de caldo filtrado/ proteasa cruda | 54% | 64% | 72% | 89% |
| Rendimiento %, de proteasa cruda/ proteasa pura | 97% | 63% | 82% | 56% |
| Rendimiento %, de caldo filtrado/ proteasa pura | 52% | 40% | 59% | 50% |

EXTRACCION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN

LABORATORIO

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, fermentados con diferentes medios de cultivo y colonias.

Las tablas 29 y 30 presentan los diferentes valores, promedios de 6 pruebas, de actividades queratinolítica y hemoglobinolítica obtenidos en la extracción de los caldos fermentados con los medios - SP-1 y E-4.

Los caldos fermentados filtrados con actividades máximas, en actividad hemoglobinolítica y queratinolítica, se obtienen con los procedentes de siembras con la colonia blanca en el medio E-4. Asimismo, las mayores cantidades de proteasa cruda y purificada se obtienen con esta colonia y medio.

El valor máximo de la actividad queratinolítica en la proteasa cruda y purificada, se obtiene con la colonia blanca en el medio E-4, y la actividad hemoglobinolítica máxima con la colonia blanca,

en el medio SP-1. Los valores obtenidos con la colonia roja son inferiores.

Comparando los productos obtenidos con el medio estándar, los incrementos mayores de actividad hemoglobinolítica han sido en los medios SP-1 y E-4 con los dos tipos de colonias. Igual sucede con la actividad queratinolítica: los mejores valores se obtienen con el medio SP-1.

El mayor rendimiento de caldo filtrado/proteasa purificada se obtiene con el medio testigo, seguido de la colonia blanca en el medio SP-1 para la actividad queratinolítica y en el medio E-4 para la actividad hemoglobinolítica.

TABLA 29

Extracción de enzimas proteolíticos en Laboratorio.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, fermentados con diferentes medios de cultivo y colonias.

Actividades Queratinolíticas.

| Caldos fermentados en Planta Semipiloto | Medio SP-1 | | Medio E-4 | | Medio Testigo |
|---|----------------|--------------|----------------|--------------|--------------------------|
| | Colonia Blanca | Colonia Roja | Colonia Blanca | Colonia Roja | Colonia Testigo Original |
| Actividad caldo fermentado, UQ/ml. | 4.630 | 2.593 | 9.138 | 2.837 | 1.964 |
| Volumen caldo filtrado, ml. | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 |
| Actividad caldo filtrado, UQ/ml. | 4.225 | 2.462 | 8.823 | 2.664 | 1.755 |
| Peso proteasa cruda obtenida g. | 8,59 | 9,09 | 12,00 | 5,19 | 9,31 |
| Actividad proteasa cruda, UQ/mg. | 1.067 | 713 | 1.115 | 873 | 433 |
| Peso proteasa pura obtenida g. | 1,98 | 1,51 | 4,77 | 2,23 | 3,47 |
| Actividad proteasa pura, UQ/mg. | 3.194 | 2.146 | 2.440 | 1.198 | 1.057 |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa cruda | 72% | 88% | 50% | 57% | 77% |
| Rendimiento %, proteasa cruda/ proteasa pura | 69% | 50% | 87% | 59% | 91% |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa pura | 50% | 44% | 44% | 33% | 70% |

TABLA 30

Extracción de enzimas proteolíticos en Laboratorio.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, fermentados con diferentes medios de cultivo y colonias.

Actividades Hemoglobinolíticas.

| Caldos fermentados en Planta Semipiloto | Medio SP-1 | | Medio E-4 | | Medio Testigo |
|---|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|--------------------------------|
| | Colonia Blanca | Colonia Roja | Colonia Blanca | Colonia Roja | Colonia Testigo Original |
| Actividad caldo fermentado, UA/ml. | 15.080 | 10.743 | 17.140 | 6.380 | 3.267 |
| Volumen caldo filtrado, ml. | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 |
| Actividad caldo filtrado, UA/ml. | 14.630 | 10.585 | 16.650 | 6.220 | 3.141 |
| Peso proteasa cruda obtenida g. | 8,59 | 9,09 | 12,0 | 5,19 | 9,31 |
| Actividad proteasa cruda, UA/mg. | 3.475 | 2.620 | 2.915 | 2.478 | 597 |
| Peso proteasa pura obtenida g. | 1,98 | 1,51 | 4,77 | 2,23 | 3,47 |
| Actividad proteasa pura, UA/mg. | 9.629 | 5.184 | 7.253 | 4.324 | 1.120 |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa cruda | 68% | 75% | 70% | 69% | 59% |
| Rendimiento %, proteasa cruda/ proteasa pura | 64% | 33% | 99% | 75% | 70% |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa pura | 43% | 25% | 69% | 52% | 41% |

EXTRACCION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN
LABORATORIO.

Extracción de caldo de Planta Semipiloto, cosechados
con distintas actividades finales.

En las tablas 31 y 32 se observan los valores prome -
dios obtenidos de ocho pruebas realizadas, excepto para los caldos -
fermentados con 8.000 - 10.000 UA/ml; sólo se pudo trabajar con seis
de ellos, ya que los dos restantes se desecharon por presentar gran -
des anormalidades.

Se trabajó con volúmenes de 3.000 ml. de caldo filtra -
do, agrupando los caldos fermentados según las diferentes actividades.

De los caldos que proceden de fermentaciones con me -
nos de 6.000 UA/ml. se obtienen productos, proteasas crudas y puri -
ficadas, con actividades inferiores a las obtenidas con caldos de apro -
ximadamente 7.000 UA/ml. o más.

En los intervalos que van de 6.000 - 12.000 UA/ml.,

se obtienen productos crudos y purificados cuyas actividades hemoglobínicas están próximas a las obtenidas en el proceso estándar. Sin embargo, cuando los caldos fermentados tienen actividades de 12.000 - 15.000 UA/ml. y mayores, se produce un gran aumento en la actividad de los productos crudos y purificados, llegándose a conseguir actividades de más de 1.000 UA/mg. y más de 1.500 UA/mg. en productos crudos, y hasta más de 2.000 UA/mg. en productos purificados.

En actividades queratinolíticas, los caldos fermentados con hasta 12.000 UA/ml. dan lugar a productos crudos y purificados con actividades mucho menores que las de los caldos de más de 12.000 UA/ml.

Es decir que a partir de caldos con actividades superiores a 12.000 UA/ml. hay un sensible aumento en la actividad de los productos crudos y puros.

Se puede decir por tanto que en la actividad hemoglobínica existe un paralelismo entre las actividades de los caldos fermentados y los productos obtenidos de estos caldos. Asimismo, se ve que en las actividades queratinolíticas, el incremento de la actividad que se produce en los productos crudos y purificados obtenidos, es sensiblemente inferior.

TABLA 31

Extracción de enzimas proteolíticos en Laboratorio.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, cosechados con distintas - actividades finales.

Actividades Queratinolíticas.

| Caldos fermentados en Planta Semipiloto. UA/ml.promedio | <6.000 | 6-8.000 | 8-10.000 | 10-12.000 | 12-15.000 | >15.000 |
|---|--------|---------|----------|-----------|-----------|---------|
| Actividad caldo fermentado, UQ/ml. | 2.580 | 2.890 | 3.220 | 3.418 | 4.417 | 4.630 |
| Volumen de caldo filtrado, ml. | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 |
| Actividad caldo filtrado, UQ/ml. | 2.323 | 2.805 | 3.143 | 3.292 | 4.157 | 4.332 |
| Peso proteasa cruda obtenida g. | 21,9 | 20,4 | 28,5 | 27,9 | 20,4 | 21,9 |
| Actividad proteasa cruda, UQ/mg. | 165 | 173 | 170 | 195 | 366 | 379 |
| Peso proteasa pura obtenida g. | 9,3 | 8,4 | 14,1 | 16,8 | 11,7 | 14,4 |
| Actividad proteasa pura, UQ/mg. | 271 | 315 | 292 | 299 | 491 | 484 |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa cruda | 57% | 42% | 51% | 59% | 63% | 67% |
| Rendimiento %, proteasa cruda/ proteasa pura | 70% | 75% | 85% | 71% | 77% | 84% |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa pura | 40% | 31% | 43% | 42% | 49% | 56% |

TABLA 32

Extracción de enzimas proteolíticos en Laboratorio.

Extracción de caldos de Planta Semipiloto, cosechados con distintas - actividades finales.

Actividades Hemoglobinolíticas.

| Caldos fermentados en Planta Semipiloto. UA/ml.promedio | <6.000 | 6-8.000 | 8-10.000 | 10-12.000 | 12-15.000 | >15.000 |
|---|--------|---------|----------|-----------|-----------|---------|
| Volumen caldo filtrado, ml. | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 3.000 |
| Actividad caldo filtrado, UA/ml. | 4.760 | 7.053 | 9.040 | 10.782 | 13.479 | 18.000 |
| Peso proteasa cruda obtenida g. | 21,9 | 20,4 | 28,5 | 27,9 | 20,4 | 21,9 |
| Actividad proteasa cruda, UA/mg. | 416 | 537 | 630 | 515 | 1.085 | 1.513 |
| Peso proteasa pura obtenida g. | 9,3 | 8,4 | 14,1 | 16,8 | 11,7 | 14,4 |
| Actividad proteasa pura, UA/mg. | 675 | 1.110 | 1.160 | 1.142 | 1.937 | 2.300 |
| Rendimiento %, caldo filtrado/proteasa cruda | 64% | 52% | 66% | 44% | 55% | 61% |
| Rendimiento %, proteasa cruda/proteasa pura | 69% | 85% | 91% | 89% | 102% | 100% |
| Rendimiento %, caldo filtrado/proteasa pura | 44% | 44% | 60% | 39% | 56% | 61% |

EXTRACCION DE ENZIMAS PROTEOLITICOS EN PLANTA

PILOTO

Extracción de caldos de Planta Piloto.

En la tabla 33, se expresan los valores promedio obtenidos de las 10 pruebas de extracción que se realizaron en Planta Piloto para comparar con el proceso de extracción del Laboratorio. Se partió de una actividad promedio de 17.385 UA/ml. y 6.568 UQ/ml. en caldo filtrado.

Los pesos de proteasa cruda y pura obtenidas son respectivamente de 15, 16 y 3,57 g. La actividad de la proteasa cruda es de 2.270 UA/mg. y 880 UQ/mg. y en proteasa purificada se consiguieron 8.483 UA/mg. en actividad hemoglobinolítica y 2.060 UQ/mg. en actividad queratinolítica.

Comparando esta tabla 33, con la 22, se vé que el incremento alcanzado en la actividad del producto crudo obtenido es de un 333% en UA/mg. y que para producto purificado, los incrementos son de un 430% en UQ/mg. y de un 726% en UA/mg. Además, el rendimiento

- 263 -

de caldo filtrado/proteasa purificada ha aumentado en la extracción en Planta Piloto en cuanto a la actividad hemoglobinolítica, siendo los valores de actividad queratinolítica algo más bajos.

TABLA 33

Extracción de enzimas proteolíticos en Planta Piloto.

Extracción de caldos de Planta Piloto, fermentados con Medio E-4.

| Fermentación en Planta Piloto | Actividades Hemoglobinolíticas | Actividades Queratinolíticas |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|
| Actividad del caldo fermentado | 17.520 UA/ml. | 6.980 UQ/ml. |
| Actividad promedio caldo filtrado | 17.385 UA/ml. | 6.568 UQ/ml. |
| Peso proteasa cruda obtenida g. | 15,16 | 15,16 |
| Actividad proteasa cruda | 2.270 UA/mg. | 880 UQ/mg. |
| Peso proteasa pura obtenida g. | 3,57 | 3,57 |
| Actividad proteasa pura | 8.483 UA/mg. | 2.060 UQ/mg. |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa cruda | 66% | 68% |
| Rendimiento %, proteasa cruda/ proteasa pura | 88% | 55% |
| Rendimiento %, caldo filtrado/ proteasa pura | 58% | 37% |

5. PRODUCTOS OBTENIDOS

Los enzimas proteolíticos se obtuvieron por fermentación sumergida de la cepa seleccionada de Streptomyces fradiae, siguiendo los procedimientos originales expuestos para la fermentación y los de aislamiento y purificación subsiguientes.

De esta forma se obtuvo una proteasa con actividad sobre proteínas tan variadas como son la hemoglobina y la queratina, y que cubría además un amplio espectro de proteínas intermedias sobre las que se probó su actividad enzimática.

Como se describirá más adelante, la eficacia de estos enzimas proteolíticos se ha demostrado en diversas aplicaciones industriales tales como :

- Depilación de pieles
- Productos farmacéuticos
- Productos para ganadería
- Productos para cervecía

Dependiendo de las colonias seleccionadas, de los inóculos, de los medios de cultivo y de las condiciones de fermentación y extracción, se obtienen tres tipos de productos proteolíticos marcadamente diferentes en alguna de sus características:

A: Enzimas proteolíticos de alta concentración, obtenidos a partir de la cepa de Streptomyces fradiae nuestra, preparada para esta producción y que son los más semejantes a los obtenidos y empleados en el mundo, procedentes de diversos Actynomicetos. El producto sólido, pulverulento, tiene una actividad de aproximadamente 10.000 - UA/mg.

Se emplean en preparados farmacéuticos, como aditivos de alimentos, y por su alta actividad sobre los materiales proteicos, - en todos aquellos casos en que se necesite una gran acción proteolítica.

B: A partir de los enzimas concentrados A, se prepara el tipo B, de unas 2.000 UA/mg., mezclándolos con productos excipientes solubles, como lactosa o almidón soluble, con control en el producto final obtenido de sus características físico-químicas y actividad proteolítica.

C: Este tipo se prepara especialmente para su empleo en la fabricación de cervezas.

Se presenta a una concentración de 1.000 UA/mg., tamizado y mezclado con lactosa grado farmacéutico.

Se utiliza disolviéndole previamente en una pequeña cantidad de cerveza y añadiéndole así disuelto, a los tanques de guarda durante el llenado de éstos con objeto de que se obtenga una buena dispersión.

Los tres productos A, B y C son muy estables, hasta 24 meses a temperatura ambiente.

Además son muy solubles, incluso en concentraciones altas y de fácil manejo y almacenamiento.

Las concentraciones en las que se utilizan tienen una gran actividad proteolítica y son atóxicas. Las diferencias analíticas entre estos productos y sus características especiales, se darán en los apartados correspondientes.

5.1. Características generales

Los enzimas proteolíticos se obtienen por fermentación en cultivo sumergido de Streptomyces fradiae y una vez separados de los caldos de fermentación, se purifican hasta conseguir el mayor grado de concentración y pureza.

Estos enzimas tienen olor característico y color de blanco parduzco a marrón oscuro.

La solubilidad en agua es muy alta y lenta dependiendo, por supuesto, de la concentración, se disuelve con mayor rapidez en tampones a pH = 8,0 - 8,5 y a estos rangos de pH. se obtiene su acción proteolítica óptima. Las soluciones muy concentradas, presentan un color rojizo, que pasa a amarillo o amarillo pálido en las más diluídas.

Actúan sobre un gran número de proteínas ordinarias, habiéndose comprobado su acción hemoglobinolítica, caseinolítica, gelatinolítica y azocaseinolítica, (54). Una propiedad poco común en otras proteasas y que se ha comprobado en las proteasas nuestras es que su acción queratinolítica se potencia con reductores débiles (tipo sulfito sódico).

Estabilidad de las proteasas obtenidas

Se ha realizado un estudio sobre la estabilidad de los enzimas proteolíticos obtenidos como producto sólido y en solución.

Los enzimas en polvo, a temperatura ambiente y en estado seco, son extraordinariamente estables a la acción de la temperatura, si se conservan en las condiciones normales de almacenamiento.

Al someter estos enzimas a un calentamiento en estufa seca a 100° C. durante 22 horas, se obtuvieron los resultados sobre su actividad enzimática y estabilidad, que se indican en la tabla 34 y se representan en la curva 22; puede verse que durante la primera hora de calentamiento no hay pérdida detectable de actividad, y transcurridas las tres primeras horas conserva aún un 90% de la actividad inicial. Al final del tiempo indicado, 22 horas, el producto conserva un 82% de la actividad original.

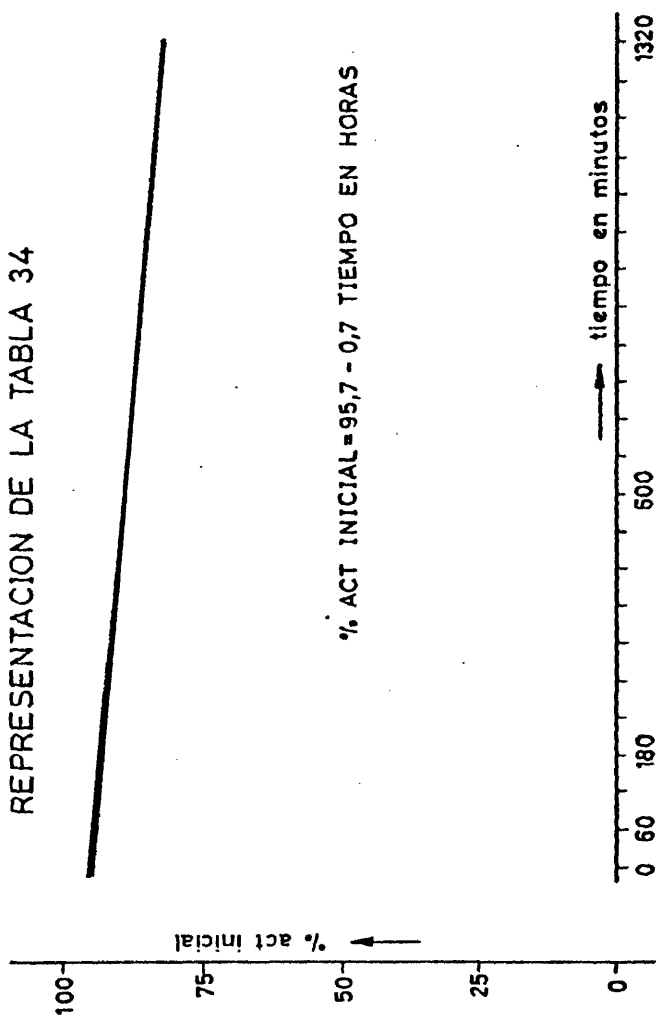
La estabilidad de las soluciones de los enzimas proteolíticos, obtenidos como consecuencia de nuestro trabajo, está en función de la temperatura de almacenamiento de las mismas, así como de la presencia de iones estabilizadores en el medio de actuación.

El ión cálcico, Ca^{++} , demuestra poseer una acción estabilizadora notable incluso a concentraciones relativamente pequeñas.

En la curva 23 se representa la estabilidad de las soluciones de enzimas, a un pH = 6,0 y una temperatura de 37°C., cuando éstas llevan o no el ión calcio. La solución enzimática inicial tenía una actividad de 11.000 UA/ml. En el caso de no llevar estas soluciones el ión calcio, se aprecia un rápido y notable descenso de la actividad de dichas soluciones en los 5 primeros días del proceso, mientras que en las soluciones que llevan el ión calcio la actividad disminuye

CURVA 22

ESTABILIDAD DE LA PROTEASA DE S.f. EN ESTADO
SOLIDO. CALENTAMIENTO EN ESTUFA SECA A 100°C
REPRESENTACION DE LA TABLA 34



% ACT INICIAL = 95,7 - 0,7 TIEMPO EN HORAS

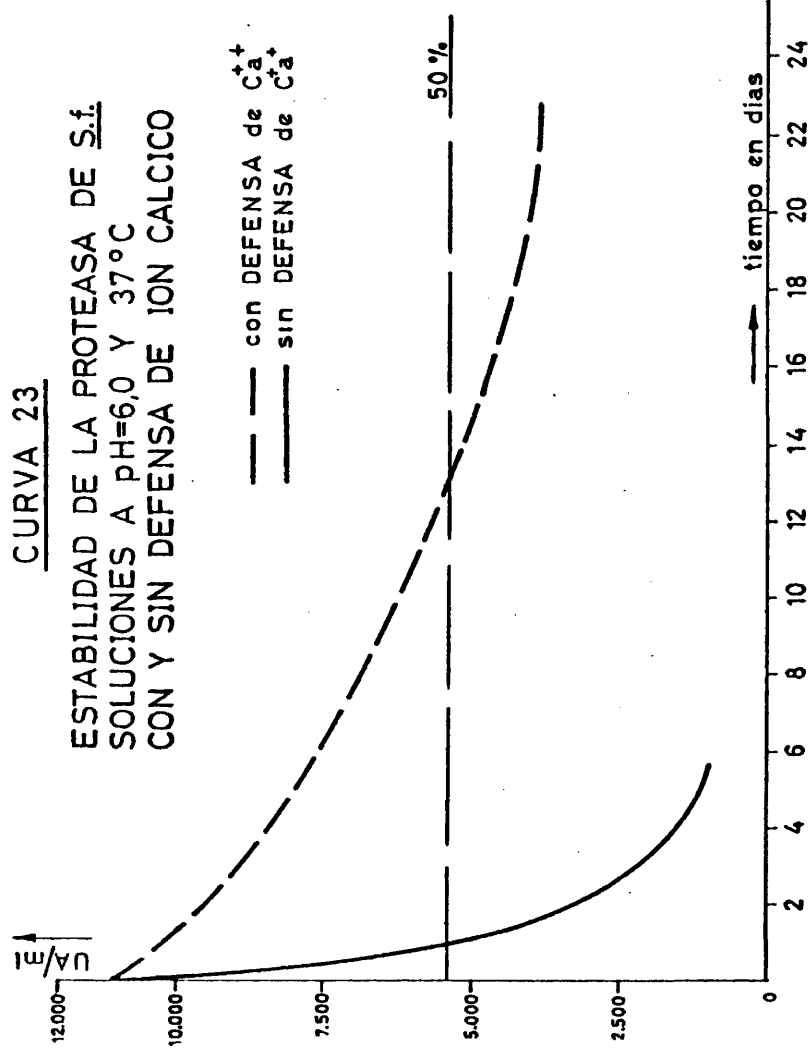


TABLA 34

ESTABILIDAD DE PROTEASA DE STREPTOMYCES FRADIAE, EN ESTADO
SOLIDO, A 100º C.

| <u>TIEMPO</u> | <u>UA/mg.</u> | <u>% ACTIVIDAD INICIAL</u> |
|---------------|---------------|----------------------------|
| 0 | 8.532 | 100,0 % |
| 15 minutos | 8.406 | 98,5 % |
| 30 minutos | 8.029 | 94,1 % |
| 45 minutos | 8.139 | 95,3 % |
| 60 minutos | 8.411 | 98,5 % |
| 2 horas | 7.436 | 87,1 % |
| 3 horas | 7.684 | 90,0 % |
| 22 horas | 6.955 | 81,5 % |

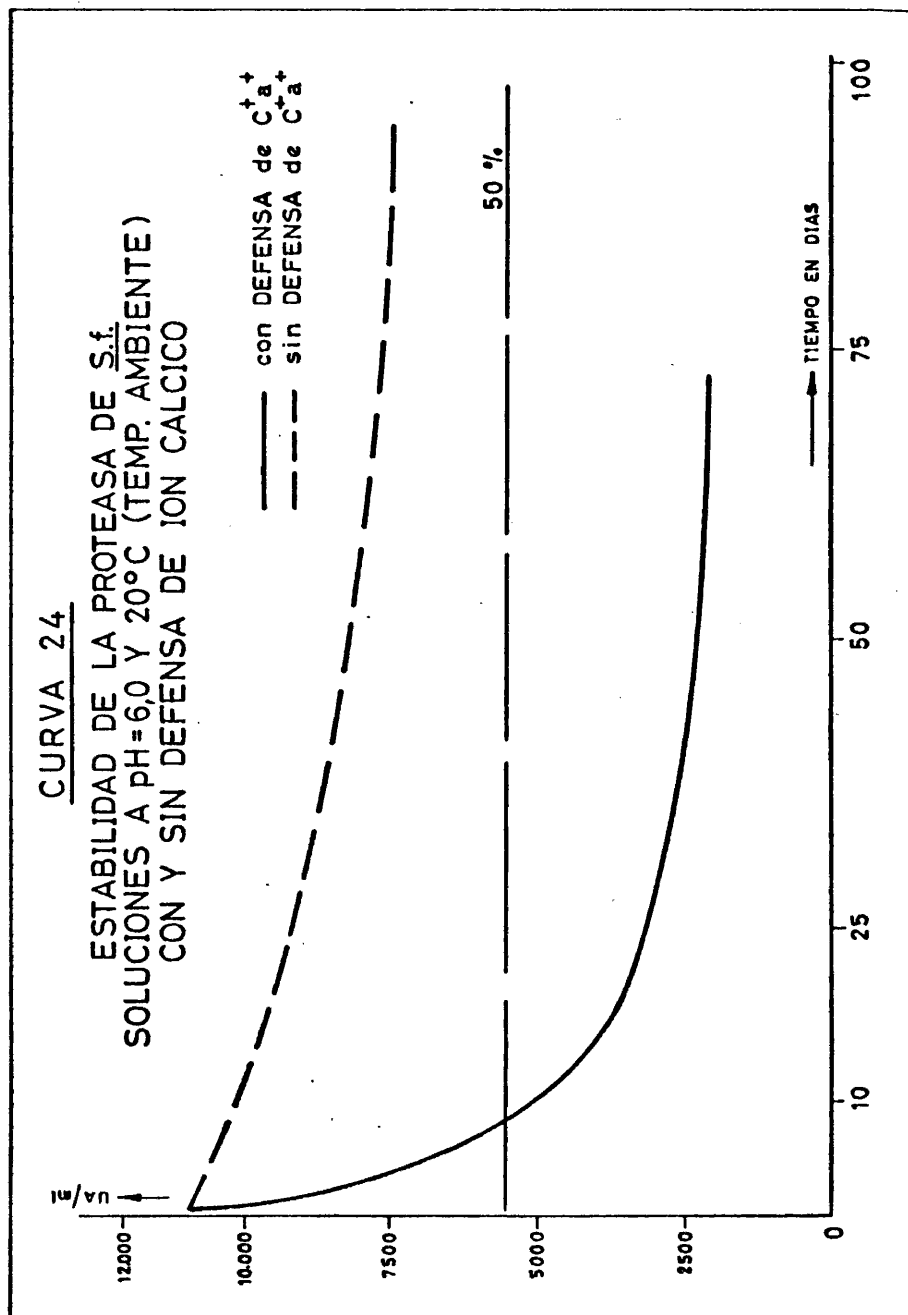
lentamente, conservando en el duodécimo día de la prueba, un 50% de la actividad inicial. Al final de los 22 días se conserva aproximadamente un 30% de la actividad.

El estudio efectuado sobre las soluciones enzimáticas a temperatura ambiente, pH = 6,0 y con la presencia y ausencia del ión calcio, se resume en la curva 24; cuando no se adiciona el ión calcio, la estabilidad de la solución es inferior al 50% en los 10 primeros días de la experiencia. Sin embargo al suplementar las soluciones con él, la estabilidad es superior al 50% al cabo de los 100 días de prueba.

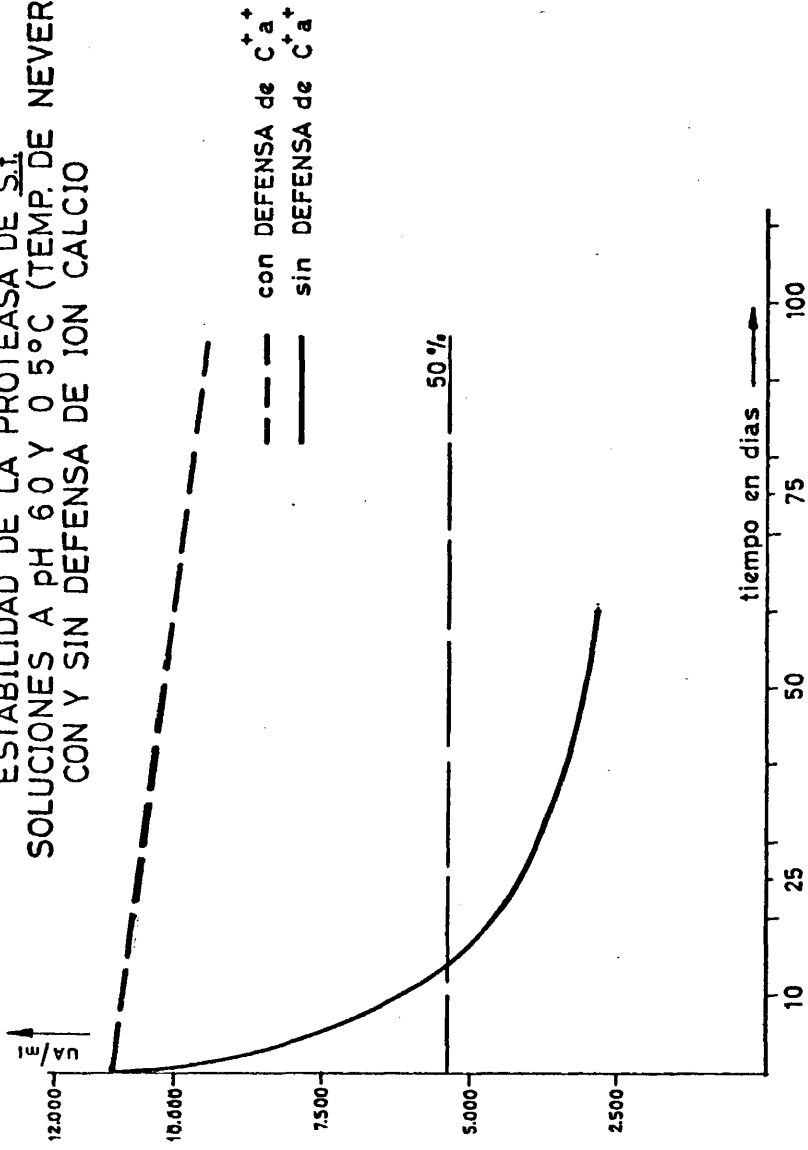
La curva 25 muestra la estabilidad de las soluciones de proteasa almacenadas en frigorífico, (temperatura de 0-5°C.), con un pH = 6,0 y durante un período de tres meses.

Se indica en ella que en este largo período de tiempo, la inactivación es inferior al 20% de la actividad inicial en presencia del ión calcio, a diferencia del notable descenso de la actividad inicial, aproximadamente un 70%, cuando éste falta.

Por tanto, de este estudio se deduce que las mejores condiciones para la conservación de las soluciones de nuestros enzimas proteolíticos es una temperatura de 0,5°C. en presencia de ión



CURVA 25
ESTABILIDAD DE LA PROTEASA DE S.f.
SOLUCIONES A PH 6.0 Y 0 5°C (TEMP. DE NEVERA)
CON Y SIN DEFENSA DE ION CALCIO



calcio como estabilizador.

Otra experiencia efectuada fué estudiar la actividad de las soluciones de estas enzimas proteolíticas con la adición de calcio y conservados a temperatura ambiente.

En la curva 26, se expresan las actividades conservadas durante el almacenamiento de las soluciones enzimáticas filtradas, ajustadas a diferentes pH, (preparados con tampones de citratos o boratos para los pH respectivos según "Methods in Enzymology"), (55). Se vé que la mayor retención de la actividad es pH 8,2, zona de máxima actividad de la proteasa en solución, seguida de la zona desde ligeramente neutra, a la alcalina, pH de 5,6 a 9,2.

Reforzamiento de la actividad

Los inhibidores típicos de la tripsina no causan notable inhibición en los enzimas proteolíticos nuestros., tanto provengan del reino animal, como del vegetal.

Como apuntábamos en 5.1, los reductores intermedios tipo sulfito, tienen una acción potenciadora del efecto enzimático en sustratos queratinosos. Esta propiedad se expone en las tablas 35,36 y 37.

CURVA 26

ESTABILIDAD DE LA PROTEASA DE S.f.
SOLUCIONES A DIFERENTES pH
CONSERVACION DE LA ACTIVIDAD

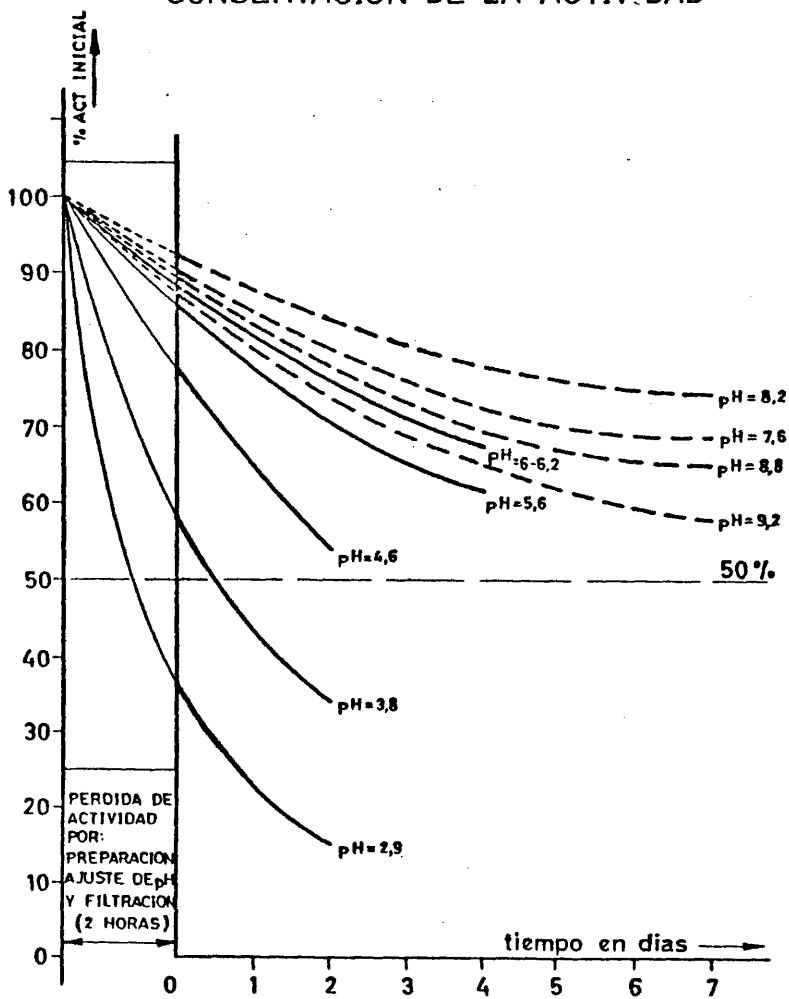


TABLA 35

ESTABILIDAD E INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEASA de s. f. CON
UREA-BISULFITO SODICO.

| S O L U C I O N E S | pH de la solución | Actividad UQ/ml. | |
|--|----------------------|------------------|-----------|
| | | a los 30' | a los 60' |
| <u>Solución - Testigo</u> | | | |
| Producto QA-5/5 (50 UQ/mg.) 5,0 g. Agua destilada..... 100 ml. | 7,0 - 8,0 | 2.370 | 2.605 |
| <u>Solución 1</u> | | | |
| Producto QA-5/5..... 5,0 g. Bisulfito sódico 2,0 g. Agua destilada 100 ml. | 6,0 - 7,0 | 4.100 | 6.800 |
| <u>Solución 3</u> | | | |
| Producto QA-5/5 5,0 g. Urea 2,0 g. Agua destilada 100 ml. | 7,0 - 8,5 | 2.640 | 4.000 |
| <u>Solución 7</u> | | | |
| Producto QA-5/5 5,0 g. Bisulfito sódico 0,5 g. Urea 2,5 g. Agua destilada 100 ml. | 6,0 - 7,0 | 4.750 | 3.445 |
| <u>Solución 8</u> | | | |
| Producto QA-5/5 5,0 g. Bisulfito sódico 1,0 g. Urea 2,5 g. Agua destilada 100 ml. | 6,0 - 7,0 | 5.400 | 5.650 |
| <u>Solución 9</u> | | | |
| Producto QA-5/5 5,0 g. Bisulfito sódico 1,0 g. Urea 5,0 g. Agua destilada 100 ml. | 6,0 - 7,0 | 4.300 | 5.350 |
| <u>Solución 10</u> | | | |
| Producto QA-5/5 5,0 g. Bisulfito sódico 2,0 g. Urea 2,0 g. Agua destilada 100 ml. | 6,0 - 7,0 | 4.800 | 6.550 |

TABLA 36

**ESTABILIDAD E INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEASA de *S. f.* CON -
UREA, SULFITO Y BISULFITO SODICO**

| S O L U C I O N E S | pH de la solución | Actividad UQ/ml. | |
|------------------------------------|----------------------|------------------|-----------|
| | | a los 30' | a los 60' |
| <u>Solución - Testigo</u> | . | | |
| Producto QA-5/5 (50 UQ/mg.) 5,0 g. | 7,0 - 8,0 | 2.425 | 2.400 |
| Agua destilada 100 ml. | | | |
| <u>Solución 1</u> | | | |
| Producto QA-5/5 5,0 g. | 7,0 - 8,0 | 4.810 | 6.450 |
| Bisulfito sódico 2,0 g. | | | |
| Agua destilada 100 ml. | | | |
| <u>Solución 2</u> | | | |
| Producto QA-5/5 5,0 g. | 7,0 - 8,0 | 6.530 | 7.150 |
| Sulfito sódico 2,0 g. | | | |
| Agua destilada 100 ml. | | | |
| <u>Solución 3</u> | | | |
| Producto QA-5/5 5,0 g. | 7,0 - 8,5 | 2.310 | 3.850 |
| Urea 2,0 g. | | | |
| Agua destilada 100 ml. | | | |
| <u>Solución 4</u> | | | |
| Producto QA-5/5 5,0 g. | 7,0 - 8,0 | 4.200 | 6.400 |
| Sulfito sódico 1,0 g. | | | |
| Agua destilada 100 ml. | | | |
| <u>Solución 5</u> | | | |
| Producto QA-5/5 5,0 g. | 7,0 - 8,5 | 6.800 | 7.350 |
| Sulfito sódico 3,0 g. | | | |
| Agua destilada 100 ml. | | | |

TABLA 37

ESTABILIDAD E INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEASA de *S. f.* CON
SULFITO SODICO

| S O L U C I O N E S | pH de la solución | Actividad UQ/ml. | |
|--|----------------------|------------------|-----------|
| | | a los 30' | a los 60' |
| <u>Solución - Testigo</u> Producto QA-5/5 (50 UQ/mg.) 5,0 g. Agua destilada 100 ml. | 7,0 - 8,0 | 2.590 | 2.630 |
| <u>Solución 2</u> Producto QA-5/5 5,0 g. Sulfito sódico 2,0 g. Agua destilada 100 ml. | 7,0 - 8,0 | 7.050 | 8.200 |
| <u>Solución 5</u> Producto QA-5/5 5,0 g. Sulfito sódico 3,0 g. Agua destilada 100 ml. | 7,0 - 8,5 | 6.350 | 6.950 |
| <u>Solución 6</u> Producto QA-5/5 5,0 g. Sulfito sódico 4,0 g. | 7,0 - 8,5 | 7.730 | 9.790 |

Se efectuaron tres series de pruebas para determinar la estabilidad de los enzimas, en soluciones que contenían urea-bisulfito sódico o cada uno de estos compuestos sólomente.

Se utilizó para estas pruebas el producto (QA-5/5), a 2.500 UA/ml. de concentración y temperatura de 35°C.; las variables fueron los tiempos en que estuvieron las muestras en solución. Los pH de las soluciones de pruebas son los indicados.

Los resultados se expresan en las tablas A, B y C y cada valor dado de actividad, es el promedio de tres matraces.

A la vista de estos resultados, vemos que el empleo del sulfito sódico refuerza la acción de estos enzimas proteolíticos.

Toxicidad

La toxicidad de los enzimas proteolíticos de S. fradiae se ha estudiado en el doble aspecto de toxicidad aguda y toxicidad crónica, ambas por vía oral.

Las pruebas de toxicidad aguda se han realizado sobre ratones, con enzimas proteolíticos obtenidos de diferentes lotes de fermentación y extracción y estudiando en ellos el curso de las pruebas de toxicidad en cuanto a mortalidad, morbilidad y curva de creci-

miento. La dosis añadida a la dieta de prueba, fué del orden de --
1.000.000 de UA/Kg. de pienso.

En todos los casos, se aprecia, durante la duración de la prueba de 10 a 30 días, un estado sanitario normal en el grupo de ratones alimentados con pienso añadido de enzimas proteolíticos de C.E.P.A. y aún en algunos casos mejor curva de crecimiento respecto al grupo testigo. No hubo ningún tipo de mortalidad en los ratones sometidos al ensayo.

Las pruebas de toxicidad crónica se han efectuado sobre pollos recién nacidos que se alimentaron con piensos adicionados de los mismos enzimas proteolíticos, con dosis de entre 1×10^6 y 10×10^6 UA/kg. de alimento, hasta su sacrificio a las 9 ó 10 semanas de vida.

En todos los casos, el estado sanitario del grupo de pollos con alimentación añadida de enzimas, fué igual o mejor que el grupo testigo con alimentación sin adición de proteasa.

Esta ausencia de toxicidad en los enzimas proteolíticos nuestros, ha permitido, además, su uso en preparados farmacéuticos como se comenta en el capítulo correspondiente.

5.2. Tablas analíticas

Las tablas analíticas que se presentan a continuación corresponden a los productos tipos A, B y C y los resultados corresponden a los análisis promedios de estos productos y que se exponen como resumen de sus especificaciones. Tablas 38, 39 y 40.

TABLA 38

ANALISIS MEDIO DE PROTEASAS de s. f. - TIPO A

| | |
|-------------------------------------|-------------------------|
| <u>Físico-Químico</u> | |
| Forma y Aspecto | Polvo limpio |
| Color | Pardo |
| Olor | Característ. |
| Humedad (K.F.) | 2 - 5% |
| Solubilidad al 1% | 97% |
| Riqueza Mét. Anson \pm 5% | 10.000 UA/mg. |
| Riqueza Mét. Queratinolít. \pm 5% | 3.000 UQ/mg. |
| pH solución al 1% | 5,5 - 6,5 |
| Sulfatos (como SO_4) | 2 - 4% |
| Cloruros (como Cl) | Indicios |
| Cenizas minerales | 4 - 10% |
| Arsénico, cobre, cobalto | No contiene |
| Níquel, manganeso, antimonio | No contiene |
| Metales pesados | No contiene |
| Zinc | Indicios |
| Hierro | 10 a 30 ppm. |
| Sales amónicas (SO_4) | 40 - 50% |
| Proteína (N.albuminoideo x 6,25) | 25 - 35% |
| Estabilidad (Tª ambiente) | 24 meses |
| <u>Microbiológico y Biológico</u> | |
| Gérmenes viables/g. | 40-80 x 10 ³ |
| Esporos | Ninguno |
| Hongos y levaduras | Ninguno |
| Enterobacteriáceas | Ninguno |
| <u>Staphylococcus aureus</u> | Ninguno |
| <u>Bacillus cereus</u> | 50 - 200/g. |
| <u>Salmonella sp.</u> | Ninguno |
| Toxicidad | Atóxica |

TABLA 39

ANALISIS MEDIO DE PROTEASAS de S.a.f.- TIPO B

| <u>Físico-Químico</u> | |
|-------------------------------------|-------------------------|
| Forma y Aspecto | Polvo limpio |
| Color | Pardo claro |
| Olor | Característ. |
| Humedad (K.F.) | 2 - 5% |
| Solubilidad al 1% | 99% |
| Riqueza Mét. Anson \pm 5% | 2.000 UA/mg. |
| Riqueza Mét. Queratinolít. \pm 5% | 500 UQ/mg. |
| pH solución al 1% | 5,5 - 6,5 |
| Sulfatos (como SO ₄) | 1 - 2% |
| Cloruros (como Cl) | Indicios |
| Cenizas minerales | 2 - 5% |
| Arsénico, cobre, cobalto | No contiene |
| Níquel, manganeso, antimonio | No contiene |
| Metales pesados | No contiene |
| Zinc | Presencia no cifrable |
| Hierro | 7 a 10 ppm. |
| Sales amónicas (SO ₄) | 20 - 40% |
| Proteína (N. albuminoideo x 6,25) | 15 - 30% |
| Diluyente | Lactosa |
| Estabilidad (Tª ambiente) | 24 meses |
| <u>Microbiológico y Biológico</u> | |
| Gérmenes viables/g. | 20-60 x 10 ³ |
| Esporos | Ninguno |
| Hongos y levaduras | Ninguno |
| Enterobacteriáceas | Ninguno |
| <u>Staphylococcus aureus</u> | Ninguno |
| <u>Bacillus cereus</u> | 40 - 100/g. |
| <u>Salmonella sp.</u> | Ninguno |
| Toxicidad | Atóxica |

TABLA 40

ANÁLISIS MEDIO DE PROTEASAS de s.a.f. - TIPO C

| | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| <u>Físico-Químico</u> | |
| Forma y Aspecto | Polvo limpio |
| Color | Pardo claro |
| Olor | Característ. |
| Humedad (K.F.) | 2 - 5% |
| Solubilidad al 1% | 99% |
| Riqueza Mét. Anson \pm 5% | 1.000 UA/mg. |
| Riqueza Mét. Queratinolít. \pm 5% | 400 UQ/mg. |
| pH solución al 1% | 5,5 - 6,5 |
| Sulfatos (como SO_4) | 0,5 - 1% |
| Cloruros (como Cl) | Indicios |
| Cenizas minerales | 1 - 4% |
| Arsénico, cobre, cobalto | No contiene |
| Níquel, manganeso, antimonio. | No contiene |
| Metales pesados | No contiene |
| Zinc | Presencia no cifrable |
| Hierro | 5 a 8 ppm. |
| Sales amónicas (SO_4) | 10 - 30% |
| Proteína (N.albuminoideo x 6,25) | 10 - 20% |
| Diluyente | Lactosa |
| Estabilidad (T^a ambiente) | 24 meses |
| <u>Microbiológico y Biológico</u> | |
| Gérmenes viables/g. | 10-50 x 10^3 |
| Esporos | Ninguno |
| Hongos y levaduras | Ninguno |
| Enterobacteriáceas | Ninguno |
| <u>Staphylococcus aureus</u> | Ninguno |
| <u>Bacillus cereus</u> | 30 - 100/g. |
| <u>Salmonella sp.</u> | Ninguno |
| Toxicidad | Atóxica |

6. EMPLEO DE LOS ENZIMAS PROTEOLITICOS

6.1. Como productos depilantes

Los enzimas proteolíticos han demostrado ser muy eficaces en el deslanado de las pieles de corderos.

La acción queratinolítica de estos enzimas tiene las propiedades siguientes :

- Dá a la lana obtenida un brillo semejante al de la seda.
- Hace infiltrable a la lana.
- Dá a las lanas medias de cordero cruzado, un tacto - tan agradable como el de las lanas finas de corderos merinos.

Estos enzimas pueden emplearse para el deslanado de pieles con gran rendimiento en lana y de casco grueso. Conviene excluir las pieles delgadas o procedentes de animales muy jóvenes, a menos que se conceda poco valor a la piel en sí.

El procedimiento seguido para el deslanaje por depila-

ción con enzimas queratinolíticas es el siguiente :

- Reverdecimiento de las pieles
- Tratamiento enzimático
- Incubación
- Deslanado.

Antes de llegar al pelambre, las pieles deben estar bien reverdecidas. Primero se desenseban y se ponen a remojo. Se considera suficiente un remojo de dos días en molineta o cuatro días en charca. El remojo se consigue más rápidamente a una temperatura de 18-20°C. Hay que añadir al agua, para la limpieza de las pieles, 1-2% de carbonato sódico. Para evitar la putrefacción, si es preciso, se añade un antiséptico, preferiblemente Acetato de Fenil-Mercurio al 1‰.

Para el tratamiento enzimático se ha usado cualquiera de los dos métodos siguientes:

- Método del pintado:

Consiste en añadir 400 g. de enzima, de una actividad de aproximadamente 50 UQ/mg. sobre 1 litro de agua agitando hasta obtener una pasta fluída, añadiendo Acetato de Fenil-Mercurio al 1‰. Con esta pasta se recubre la piel por el lado de la carne en capa fina, cuidando que el recubrimiento sea total.

- Método de espolvoreo :

Las pieles remojadas se apilan para que escurran el agua sobrante. A continuación se espolvorea el enzima seco homogéneamente sobre el lado de la carne a razón de unos 100 g. de enzima de actividad de unas 50 UQ/mg. por piel de tamaño medio.

Las pieles, tratadas por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, se doblan por su mitad, carne contra carne, o bien se doblan por parejas tocándose por los lados de la carne, cuidando que el contacto sea completo y no queden incluidas bolsas de aire.

Se mantienen en cámara a 30-35°C. y humedad relativa del 100 por 100, o próxima a ella, durante 20-23 horas. Después de esta incubación hay usualmente un aflojado de la lana, que permite un deslanado fácil. No obstante, si existe alguna dificultad, la incubación puede prolongarse unas horas más hasta lograr un buen aflojamiento de la lana.

En la cámara de incubación las pieles deben disponerse por parejas o, cuando más, por grupos de 4 ó 5 pieles superpuestas. Hay que evitar un apilamiento mayor que impida o retrase varias horas el calentamiento de las pieles situadas en el centro del montón.

- 290 -

Después de esta incubación el deslanado se hace fácil -
mente a mano o a máquina.

La depilación por enzimas aumenta la recuperación de
la lana de un 3 a un 5%, con respecto al método tradicional del sulfuro.

La calidad y aspecto de la lana son también muy superiores.

6.2. Productos farmacéuticos

Hemos observado que los enzimas producidos por el Streptomyces fradiae, presentan también una acción de potenciación con algunos antibióticos.

Este efecto potenciador se comprobó por ensayos "in vitro" en el laboratorio, donde se determinó comparativamente el poder inhibidor de diferentes antibióticos, solos y en presencia del enzima, para cierto número de gérmenes. Tabla 41.

Estos datos eran tan prometedores que se iniciaron - una serie de ensayos a gran escala para estudiar la absorción de la tetraciclina administrada por vía oral, con proteasas del Streptomyces fradiae. Los resultados obtenidos fueron muy positivos.

El producto usado fué "Tetralén" (Clorhidrato de Tetraciclina 250 mg.) y "Tetralén" + 15 mg. de proteasas.

Después del desayuno se administra una cápsula con 15 mg. de proteasa y a las 2 horas una gragea de "Tetralén".

TABLA 41

EFECTO POTENCIADOR DEL ENZIMA SOBRE DIFERENTES ANTIBIOTICOS

| Antibiótico | Gérmenes GRAM positivos | | | | | |
|--------------|---|-------------------------|---|-------------------------|------------------|------------------------|
| | <u>Staphylococcus aureus</u> | | <u>Bacillus subtilis</u> | | | |
| | Concentración de Antibiótico en $\mu\text{g/ml.}$ | % de gérmenes inhibidos | Concentración de Antibiótico en $\mu\text{g/ml.}$ | % de gérmenes inhibidos | | |
| | | Antibiótico solo | | Antibiótico más enzima | Antibiótico solo | Antibiótico más enzima |
| Neomicina | 1 | 30% | 50% | 4 | 30% | 45% |
| Penicilina | 0,0025 | 30% | 45% | 3 | 30% | 35% |
| Tetraciclina | 0,01 | 30% | 35% | 0,1 | 30% | 35% |
| Eritromicina | 0,05 | 30% | 50% | 15 | 30% | 35% |

| Antibiótico | Gérmenes GRAM negativos | | | | | |
|--------------|---|-------------------------|---|-------------------------|------------------|------------------------|
| | <u>Escherichia coli</u> | | <u>Klebsiella pneumoniae</u> | | | |
| | Concentración de Antibiótico en $\mu\text{g/ml.}$ | % de gérmenes inhibidos | Concentración de Antibiótico en $\mu\text{g/ml.}$ | % de gérmenes inhibidos | | |
| | | Antibiótico solo | | Antibiótico más enzima | Antibiótico solo | Antibiótico más enzima |
| Neomicina | 2 | 30% | 35% | 2 | 30% | 40% |
| Penicilina | 2 | 30% | 35% | 5 | 30% | 35% |
| Tetraciclina | 0,1 | 30% | 35% | 0,1 | 30% | 45% |
| Eritromicina | 15 | 30% | 35% | 0,4 | 30% | 50% |

A continuación se determinaron los niveles de Tetraciclina en sangre, en tomas a las 2 y 3 horas de la administración del "Tetralén" y se obtuvieron los siguientes resultados :

| Casos | "Tetralén" | "Tetralén" + 15 mg. proteasa |
|-------|------------|------------------------------|
| | 2 / 3 h. | 2 / 3 h. |
| 1 . | 1,56 | 2,00 |
| 2 | 2,50 | 2,05 |
| 3 | 1,17 | 2,60 |
| 4 | 1,47 | 2,76 |
| 5 | 1,20 | 1,68 |
| 6 | 1,20 | 1,23 |
| 7 | 2,34 | 2,10 |
| 8 | 2,76 | 2,85 |
| 9 | 1,68 | 1,42 |
| 10 | 2,30 | 2,43 |
| M | 1,82 | 2,11 |

Como puede verse en la mayoría de los casos, son mayores los niveles de antibióticos en sangre cuando se han administrado los enzimas, lo que indica que éstos favorecen la absorción del medicamento.

Basados en estos datos, se iniciaron los ensayos clínicos, controlados por un grupo de técnicos especializados. Fruto de estos experimentos fué la puesta en el mercado farmacéutico de un nuevo compuesto "Mitén".

En síntesis, se demostró experimentalmente que la proteasa de Streptomyces fradiae administrada por vía oral, junto con el Clorhidrato de Tetraciclina, aumenta la absorción digestiva de esta droga, permitiendo obtener concentraciones de antibiótico en sangre más elevadas, (80% más), que cuando el antibiótico se administra solo.

Este enzima proteolítico por ser una endopeptidasa, (probablemente una serín-proteasa), se alinea por consiguiente con tripsina, quimiotripsina, trombina, etc., pero tiene una acción específica distinta a las citadas, lo mismo que éstas tienen una especificidad de acción y de substrato que las separa de las demás.

Por otra parte, la acción farmacológica potenciadora del aumento de los niveles en sangre con algunos antibióticos acentúa sus diferencias, por lo que parece deducirse que esta proteasa de Streptomyces, constituye, entre todas las endopeptidasas conocidas, una especie única en cuanto a esta cualidad de incrementar la absorción digestiva de la tetraciclina favoreciendo con ello su potencialidad antibiótica.

Otro de los trabajos realizados, fué el empleo de las proteasas de Streptomyces, en la elaboración de la especialidad "Clor-Mitén". En este caso la proteasa de Streptomyces se asocia a

partes iguales con una mezcla de tripsina y quimiotripsina, basándose en que la presencia de estas enzimas se considera conveniente y útil - para suplementar la actividad de los enzimas pancreáticos normales, que resulta menoscabada en presencia de la Tetraciclina.

Por otra parte, tripsina y quimiotripsina contribuyen también con su acción antiinflamatoria y fibrinolítica, a la resolución de los diversos procesos inflamatorios susceptibles de tratamiento con "Clor-Mitén".

Se puede afirmar sin duda que, en el "Clor-Mitén", únicamente la presencia de esta proteasa de Streptomyces, es la que garantiza clínicamente la obtención de concentraciones antibióticas más elevadas que en las medicaciones corrientes de tetraciclinas orales.

Está a disposición de todos la estadística sobre los - éxitos curativos con este preparado, pero no se considera oportuna - su presentación por salirse del tema de este trabajo. Sin embargo se debe recalcar que todo ésto no ha sido una improvisación preparativa o un hallazgo fortuito, sino el fruto de un amplio y completo programa de investigación microbiológica, química, enzimológica y farmacológica.

6.3. En Ganadería

Otra aplicación de los enzimas proteolíticos obtenidos a partir de nuestro trabajo, ha sido la utilización de la denominada - "FRADIASA" en la alimentación de animales.

La "FRADIASA" está constituida por tres enzimas, que parecen análogos pero no idénticos, a tres de los siete enzimas proteolíticos normalmente secretados por la cepa típica del Streptomyces fradiae (ATCC 10 745, o Waksman 3535). Estos tres enzimas son los - que por electroforesis, aparecían como los más básicos.

Como se vé más adelante, en la serie de ensayos realizados con conejos y aves de corral se observó un aumento en el porcentaje de peso y una disminución de la cantidad de alimento necesario por unidad de incremento de peso para animales jóvenes.

El enzima proteolítico denominado "FRADIASA", es un producto complejo enzimático obtenido, en condiciones particulares, a partir de nuestra cepa de Streptomyces fradiae.

Este enzima permite aumentar selectivamente la velocidad de absorción a través de la pared intestinal, lo cual se puede utilizar para mejorar el crecimiento de los animales (Hooreman, 1970).

Este enzima ha demostrado en las pruebas realizadas que :

- Facilita la digestión de las proteínas y aumenta la disponibilidad de sus aminoácidos.
- Provoca la evacuación del mucus intestinal en exceso, sin riesgo de alteración para la mucosa subyacente, lo que aumenta selectivamente la rapidez de absorción a través de la pared intestinal, y lo que finalmente estimula la proteinogénesis antes que la lipogénesis.
- Reduce la mortalidad y la morbilidad.
- Aumenta la rapidez de crecimiento de los animales y su productividad.
- Por vía oral no presenta ninguna toxicidad.
- No deja ningún residuo en la carne de los animales o sus productos (leche, huevos.....). Debido a su estructura y sus propiedades generales tiene un efecto comparable al de los enzimas digestivos con los cuales establece un sinergismo en la luz intestinal, que no puede franquear la barrera intestinal.

Se puede emplear en el agua de bebida y preferiblemente en los alimentos. Las dosis recomendadas son respectivamente, - 100.000 UA/litro y 200.000 UA/kg.

Acción sobre las proteínas de los alimentos

A igual concentración en Unidades Anson, la "FRADIA-SA" es netamente más activa que los enzimas pancreáticos, sobre algunas materias primas alimenticias de origen animal, y sobre la mayor parte de las materias primas alimenticias de origen vegetal.

Se comporta como una endopeptidasa pudiendo también romper algunos de los enlaces que unen las proteínas, bien de los lípidos, o de los glúcidos.

También aumenta la disponibilidad de los aminoácidos, y facilita la acción de otras proteasas, de las lipasas y de las amilasas pancreáticas sobre sus sustratos respectivos.

Su adición permite que se pueda emplear recientemente en la fabricación de los piensos compuestos, con materias primas económicas, con lo que se evita la utilización de materias primas más fácilmente digestibles, pero más caras, como la leche desnatada o la harina de pescado.

Los resultados de la tabla que a continuación se expone, indican que es especialmente activa sobre el residuo de soja, cebada y sobre todo trigo, por lo que se podría utilizar con prioridad como suplemento en la fabricación de los alimentos para ganadería, Tabla 42.

En el caso especial del salvado, cereal que se puede cultivar en diferentes climas y que es relativamente rico en proteínas, presenta inconvenientes para la alimentación animal por su gran contenido en gluten. Sin embargo al ser la "FRADIASA" un complejo enzimático capaz de solubilizarlo, este inconveniente desaparece.

TABLA 42
ACCION DE LA "FRADIASA" SOBRE CEREALES

| Materia Prima | Contenido en Proteínas. % | N soluble en % / N Total | | | Aumento N soluble en % / N soluble trigo. | |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------------|---|-----------|
| | | Testigo | Testigo más Enzimas Páncreas | Testigo más Fradiasa. | Enzimas Páncreas. | Fradiasa. |
| Harina de trigo | 12,9 | 31,3 | 34,5 | 66,5 | 10,4 | 112,6 |
| Harina de cebada | 11,5 | 27,2 | 32,3 | 47,0 | 18,9 | 54,1 |
| Harina de maíz | 11,2 | 24,2 | 24,2 | 28,8 | 0 | 18,9 |
| Resíduo de trigo | 14,2 | 28,5 | 35,8 | 68,5 | 25,1 | 139,7 |
| Resíduo de soja | 48,3 | 24,0 | 30,9 | 49,8 | 28,5 | 107,3 |
| Resíduo de cebada | 52,4 | 20,5 | 25,5 | 36,3 | 24,4 | 77,1 |
| Harina de salvado | 17,3 | 34,5 | 36,7 | 58,7 | 6,3 | 70,3 |
| Harina de carne | 58,6 | 31,2 | 41,8 | 44,2 | 33,8 | 41,6 |
| Harina de pescado | 64,7 | 45,5 | 59,4 | 61,5 | 30,5 | 35,1 |
| Harina de pluma | 74,3 | 14,1 | 17,9 | 21,6 | 27,4 | 53,2 |

Acción sobre las proteínas de la mucosa

La acción esencial de la "FRADIASA" se ejerce a nivel de la mucosa intestinal.

La mucosa intestinal, frágil como todas las mucosas, está protegida por un líquido viscoso, el mucus intestinal, que constituye una especie de barrera protectora entre la mucosa y el bolo alimenticio en el curso de la digestión.

Esta barrera evita que se establezca un contacto demasiado íntimo entre la pared intestinal y las grandes moléculas de los enzimas pancreáticos que provocan la digestión de los alimentos, y - que podrían acabar por atacar a la misma mucosa. La misión principal es filtrar rápidamente pequeñas moléculas de alimentos ya digeridos que tienen que franquear esta pared intestinal para ir al torrente sanguíneo.

Si el mucus es excesivamente viscoso, éste frena el - paso a la sangre de los alimentos digeridos. Por lo tanto, es conveniente obtener una viscosidad óptima.

Los numerosos stress sufridos corrientemente por los animales durante su cría y sobre todo en la cría intensificada, se - traducen frecuentemente en la formación de un gran exceso de mucus.

Así por ejemplo, se ha demostrado en un cerdo de 100 kgs. en ayunas, que la cantidad de mucus que contiene en los 3 primeros metros del intestino puede fácilmente variar entre 10 y 200 ml., cuando el volumen correspondiente a la luz intestinal, es de un total de 600 ml. aproximadamente.

Estas variaciones tan amplias y no deseables, de la cantidad de mucus afectan la absorción y por consiguiente la eficacia alimentaria.

La "FRADIASA" provoca una reducción moderada de la viscosidad de este mucus y permite su evacuación continua, sin provocar la menor alteración de la mucosa y de sus microvellosidades.

Como consecuencia hay un aumento de la absorción de los compuestos básicos (aminoácidos como la lisina y cationes minerales) además de los compuestos neutros o ácidos (azúcares, ácidos, grasos).

Tal selectividad es consecuencia de las propiedades físico-químicas del mucus intestinal, que se puede considerar como una resina cambiadora de iones de tipo ácido, susceptible por consiguiente de retener los compuestos básicos.

La evacuación por la "FRADIASA" del mucus en exceso,

dá a estos compuestos básicos la posibilidad de ser absorbidos rápidamente.

En fin, podemos decir que como consecuencia de una mejor absorción, se produce una aceleración en el crecimiento de los animales, tanto en cantidad como en calidad.

Acción sobre la proteinogénesis

De las observaciones efectuadas sobre conejos y vacas con respecto a la producción de carne, se puede decir que la "FRADIASA" parece estimular la proteinogénesis más que la lipogénesis.

Se ha hecho un estudio a nivel industrial sobre 40 cerdos testigos y 49 cerdos tratados que habían recibido a partir de los 20 kgs. de peso hasta su matanza, hacia los 90 kgs., una alimentación racionada suplementada o no con "FRADIASA". En este ensayo, la rapidez de crecimiento medio ha sido de unos 500 g/día, tanto para los animales tratados como para los testigos; todos recibieron una alimentación racionada en función de su edad y de su comportamiento. Las diferencias importantes registradas son :

- Índice de consumición : 2,93 para los animales tratados en lugar de 3,29 para los testigos.

- Clasificación de los esqueletos : 54% en los animales tratados, en lugar del 25%.

La concordancia entre estos dos últimos datos, confirma que estimula la proteinogénesis más que la lipogénesis, lo que resulta lógico ya que aumenta la disponibilidad de los aminoácidos y facilita su absorción.

La "FRADIASA" se puede por tanto considerar, no como un simple factor de crecimiento, sino como un verdadero factor de eficacia protéica, al lograr obtener de los animales más músculo y menos grasa.

Acción sobre el crecimiento de los animales y/o sobre su productividad

Se han obtenido resultados positivos sobre ratas, conejos, pollos, cerdos y vacas.

Se ha comprobado en cerdos la rentabilidad del empleo de la "FRADIASA", y lo más conveniente es distribuirla con el alimento desde la edad más joven hasta lograr un peso de 50 kgs.

Utilizada durante el período recomendado, permite obtener, como término medio, una disminución del índice de consumición

del 8 al 10% y un aumento de la ganancia media cotidiana de un 5% a un 10%.

Se hicieron también varios ensayos en granjas. Todas las aves fueron alimentadas con piensos, adicionados de enzimas proteolíticas.

Dos de las granjas, como ejemplo, tenían como puntos comunes; naves idénticas en cuanto a espacio, orientación, ventilación, etc., así como en capacidad: 6.500 aves por nave.

- En los dos casos se emplearon unas 6.500 aves por lote de la estirpe VANGUARD AND GARRIXON.
- Como piensos se usaron en forma de harina los denominados M-7, para arranque y crecimiento y M-8 para engorde final.

El enzima adicionado a estos piensos fué proteasa con una actividad de unas 2.000 UA/mg. y en dosis de 800.000 UA/kg. de pienso (400 gr. por Tm.).

- Las pruebas se hicieron simultáneamente con un lote - problema y otro testigo, con pollos salidos la misma - fecha de incubadora y sacrificados en la 9ª semana de vida, con crianza desde el primer día de vida, en las

jaulas.

Como puntos de diferencia estas pruebas tuvieron :

- La primera prueba se hizo en tiempo cálido y la segunda en tiempo frío.
- En la primera prueba los piensos M-7 y M-8 empleados llevaban tetraciclina, por estar ésta incluida de ordinario en los piensos, a razón de 50 g. por Tm.
- En la segunda prueba se añadió Tetraciclina base a razón de 25 g./Tm. para el lote control. Para el lote problema el aditivo fué de 1,3 Kg. de micelio rico, más 400 g. de proteasa por Tm. de pienso.

Al analizar los resultados de estas dos pruebas se observa que :

- El consumo total de piensos del problema fué ligeramente superior (un 3 %) en la primera prueba, que su testigo correspondiente y marcadamente inferior (un 6,5%) en la segunda. Esta diferencia se explica por las variaciones de supervivencias entre ambas pruebas.
- Los índices de transformación son más elevados, al -

contrario de lo que se esperaba, en la primera prueba, (tiempo cálido) que en la segunda, tiempo frío.

- La mortalidad es marcadamente inferior a la de los testigos. 1,6%, frente a 4,9% a la primera prueba y 4,8%, frente a 7,9% a la segunda.
- El peso en vivo total, es mayor para los problemas, que para los testigos.
- Se puede decir que la proteasa usada es un complejo - enzimático que permite aumentar selectivamente la rapidez de absorción a través de la pared intestinal y que mejora el estado sanitario y el crecimiento y productividad de los animales. Tabla 43.

TABLA 43

PRUEBAS REALIZADAS EN ALIMENTACION DE AVES, CON ENZIMAS
PROTEOLITICOS

RESUMEN DE LOS EXPERIMENTOS

| C O N C E P T O S | 1ª PRUEBA | | 2ª PRUEBA | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | TESTIGO | PROBLEMA | TESTIGO | PROBLEMA |
| Nº de pollos | 6.250 | 6.687 | 6.226 | 6.376 |
| Porcentajes respecto a su testigo | 100% | 107% | 100% | 102% |
| Mortalidad durante la prueba | 309 | 106 | 494 | 304 |
| Porcentajes relativos (a testigo) | 100% | 34,3% | 100% | 61,5% |
| Porcentajes absolutos (respecto a iniciales) | 4,9% | 1,6% | 7,9% | 4,8% |
| Supervivencia de aves | 5.860 | 6.581 | 5.732 | 6.072 |
| Porcentajes respecto a testigo. | 100% | 112,3% | 100% | 105,9% |
| Porcentajes absolutos respecto a inicial | 95,1% | 98,4% | 92,1% | 92,5% |
| Peso en vivo final de la prueba | 7.890 kg | 8.675 kg | 7.658 kg | 8.223 kg |
| Porcentajes respecto a testigo | 100% | 110% | 100% | 107,4% |
| Peso medio por pollo | 1.346,4 g | 1.319,7 g | 1.338,4 g | 1.356,5 g |
| Porcentajes respecto a testigo | 100% | 98% | 100% | 101,4% |
| Consumo total de pienso | 22.160 kg | 22.830 kg | 20.960 kg | 19.595 kg |
| Porcentajes respecto a testigos | 100% | 103% | 100% | 93,5% |
| Indice de transformación | 2,81 | 2,63 | 2,73 | 2,32 |
| Porcentaje respecto a testigo | 100 | 93,7 | 100 | 87,6 |

6.4. En cervecería

Una aplicación importante de los enzimas está en el empleo en la fabricación de cervezas. A veces se necesitan sustancias de naturaleza proteolítica que ayuden a hidrolizar, o solubilizar, las proteínas residuales, aumentando su rendimiento y actuando además de clarificante y estabilizador coloidal, (56).

Las pruebas industriales sobre turbidez proteica de soluciones acuosas añadidas de enzimas proteolíticos de Streptomyces fradiae hechas en una fábrica de cerveza española, ponen de manifiesto su utilidad en el campo cervecero para prevenir la turbidez en el almacenamiento de los elaborados, además de confirmar resultados previos.

Para establecer un análisis estadístico del control de calidad, se realizó una prueba experimental con cervezas de dos tipos (11 y 139 Balling), obtenidas por el proceso convencional de la fábrica y añadiéndose "KERASA" (una proteasa de 1.000 UA/mg.), a dos concentraciones, al terminar la fermentación primaria y antes de pasar a

la fase de guarda en la que se produce la fermentación secundaria que dura unos 50 días. Antes del envasado final se filtró la cerveza y se pasteurizaron las botellas.

Simultáneamente, siguiéndose un procedimiento idéntico, se adicionó a otra proporción del mismo lote de cada cerveza tipo (11 y 13^o B) un preparado comercial de papaína "Proteolisín", en lugar de "KERASA", a dos concentraciones.

Para igual tipo de cerveza, la adición de "KERASA" - 1000 o "Proteolisín" comercial, no influye en las determinaciones analíticas efectuadas.

Las determinaciones de brillo se hicieron según las normas EBC, y se realizaron tras el almacenamiento a temperatura de estante y choque térmico con enfriamiento a 0° - 5° C., durante 24 horas, en los días 15, 30, 60 y 100, de vida estante. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de turbidez, lo que hace comparativa la prueba con los distintos enzimas y concentraciones.

En la tabla 44 se resumen los resultados de turbidez obtenidos para cada uno de los 6 tratamientos enzimáticos citados. Se hizo una muestra de 2 barriles en cada tratamiento y 7 botellas de cada barril (14 valores por tratamiento).

VALORES DE TURBIDEZ DE LOS DIVERSOS TRATAMIENTOS ENZIMATICOS A TIEMPO VARIABLE VIDA EN ESTANTE Y CHOQUE TERMICO

| TEMPERATURA AMBIENTE (VIDA EN ESTANTE) | | INICIAL | | 15 DIAS | | 30 DIAS | | 60 DIAS | | 100 DIAS | |
|---|---------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|----------|------|
| | | Vm | M | Vm | M | Vm | M | Vm | M | Vm | M |
| CERVEZA 119 B | | | | | | | | | | | |
| Proteolisín | 2 g/Hl. | 0,59 | 0,21 | 0,47 | 0,04 | 0,31 | 0,03 | 0,41 | 0,06 | 0,43 | 0,06 |
| Kerasa | 1 g/Hl. | 0,36 | 0,03 | 0,42 | 0,03 | 0,22 | 0,01 | 0,30 | 0,02 | 0,32 | 0,01 |
| Kerasa | 2 g/Hl. | 0,41 | 0,06 | 0,39 | 0,03 | 0,23 | 0,03 | 0,30 | 0,03 | 0,33 | 0,03 |
| CERVEZA 139 B | | | | | | | | | | | |
| Proteolisín | 4 g/Hl. | 2,28 | 1,11 | 2,29 | 0,54 | 2,33 | 0,53 | 3,14 | 0,67 | 3,20 | 0,64 |
| Kerasa | 2 g/Hl. | 0,58 | 0,22 | 0,58 | 0,12 | 0,51 | 0,13 | 0,69 | 0,17 | 0,74 | 0,18 |
| Kerasa | 4 g/Hl. | 0,84 | 0,07 | 0,88 | 0,04 | 0,75 | 0,05 | 1,10 | 0,06 | 1,13 | 0,05 |
| TEMPERATURA 09C. CHOQUE TERMICO (VIDA EN ESTANTE) + CHOQUE TERMICO (24 h. a 0-59C.) | | | | | | | | | | | |
| CERVEZA 119 B | | | | | | | | | | | |
| Proteolisín | 2 g/Hl. | 0,59 | 0,21 | 0,41 | 0,05 | 0,35 | 0,04 | 0,47 | 0,06 | 0,48 | 0,06 |
| Kerasa | 1 g/Hl. | 0,36 | 0,03 | 0,35 | 0,02 | 0,26 | 0,01 | 0,34 | 0,02 | 0,34 | 0,02 |
| Kerasa | 2 g/Hl. | 0,41 | 0,06 | 0,34 | 0,02 | 0,27 | 0,03 | 0,32 | 0,03 | 0,35 | 0,04 |
| CERVEZA 139B | | | | | | | | | | | |
| Proteolisín | 4 g/Hl. | 2,28 | 1,11 | 2,38 | 0,57 | 2,52 | 0,57 | 3,38 | 0,67 | 3,46 | 1,32 |
| Kerasa | 2 g/Hl. | 0,58 | 0,22 | 0,53 | 0,13 | 0,58 | 0,14 | 0,81 | 0,20 | 0,86 | 0,20 |
| Kerasa | 4 g/Hl. | 0,84 | 0,07 | 0,94 | 0,05 | 0,87 | 0,04 | 1,20 | 0,13 | 1,25 | 0,07 |
| Vm = Valor medio de turbidez, obtenido en cada caso sobre 7 botellas de cada barril en 2 barriles de cada tratamiento enzimático. | | | | | | | | | | | |
| M = Margen de confianza para sumar y restar el valor medio para obtener los límites de confianza de la media con una probabilidad del 95% | | | | | | | | | | | |

Se dan, bajo el epígrafe "Inicial", valores medios y márgenes de confianza para la turbidez de las cervezas recién enfriadas y embotelladas.

Los valores de turbidez corresponden a la cerveza embotellada, mantenida en estante a temperatura ambiente, el número de días que se indican (vida en estante), y a los valores de turbidez de las cervezas, que con el mismo tiempo de temperatura ambiente, se mantienen en frigorífico entre 0º-5ºC., las 24 horas precedentes a las lecturas.

El análisis de resultados indica que, para cada tratamiento enzimático correspondiente, la "KERASA" consigue en las cervezas de 11 y 13º B a las concentraciones empleadas, una menor turbidez que el enzima convencional de papaína empleado a la concentración ordinaria en fábrica.

En la cerveza de 11º B no hay diferencias significativas entre las dos concentraciones empleadas de "KERASA", ni en la turbidez absoluta, ni en la evolución de la misma, a lo largo de almacenamiento del proceso.

En la cerveza de 13º B, las diferencias entre los dos tratamientos enzimáticos son muy claras, en los valores absolutos de turbidez a favor de la "KERASA".

Otra de las variantes estudiadas, fué el incremento medio de turbidez por enfriamiento (choque térmico).

De los datos de la tabla 44, se deducen los incrementos de turbidez (Δ) causados por el enfriamiento de cada tratamiento enzimático, según las fechas de valoración de turbios. Dicho valor (Δ) expresa el incremento de turbidez por choque térmico.

La tabla 45, resume los datos obtenidos para estos incrementos y pone de manifiesto, que para cervezas de 11º B no hay diferencias apreciables en los tratamientos enzimáticos estudiados. En almacenamientos más prolongados de cerveza, el tratamiento con "KERASA" lleva a terminados con mayor estabilidad física (menor turbidez) por choque térmico.

En la cerveza de 13º B la mayor estabilidad de los tratamientos con "KERASA", en cuanto al choque térmico, se evidencia desde la primera valoración a los 15 días, manteniéndose o acentuándose con la vida en estante.

Los valores de V_m y M , se representan en la gráfica 22, donde se aprecia claramente que no hay diferencias significativas para la cerveza de 11º B en los tres tratamientos enzimáticos y que es casi nulo el incremento de turbidez por choque térmico.

TABLA 45

| <u>INCREMENTOS DE TURBIDEZ</u> | | | | | | |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|----------|
| <u>TRATAMIENTO</u> | <u>15</u> | <u>30</u> | <u>60</u> | <u>100</u> | <u>Vm</u> | <u>M</u> |
| <u>CERVEZA 11º B</u> | | | | | | |
| Proteolisin 2 g/Hl. | -0,06 | 0,04 | 0,06 | 0,05 | 0,02 | 0,05 |
| Kerasa 1 g/Hl. | -0,07 | 0,04 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,04 |
| Kerasa 2 g/Hl. | -0,05 | 0,04 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,03 |
| <u>CERVEZA 13º B</u> | | | | | | |
| Proteolisin 4 g/Hl. | 0,09 | 0,19 | 0,25 | 0,26 | 0,20 | 0,07 |
| Kerasa 2 g/hl. | -0,05 | 0,07 | 0,12 | 0,12 | 0,06 | 0,06 |
| Kerasa 4 g/Hl. | 0,06 | 0,12 | 0,10 | 0,12 | 0,10 | 0,03 |

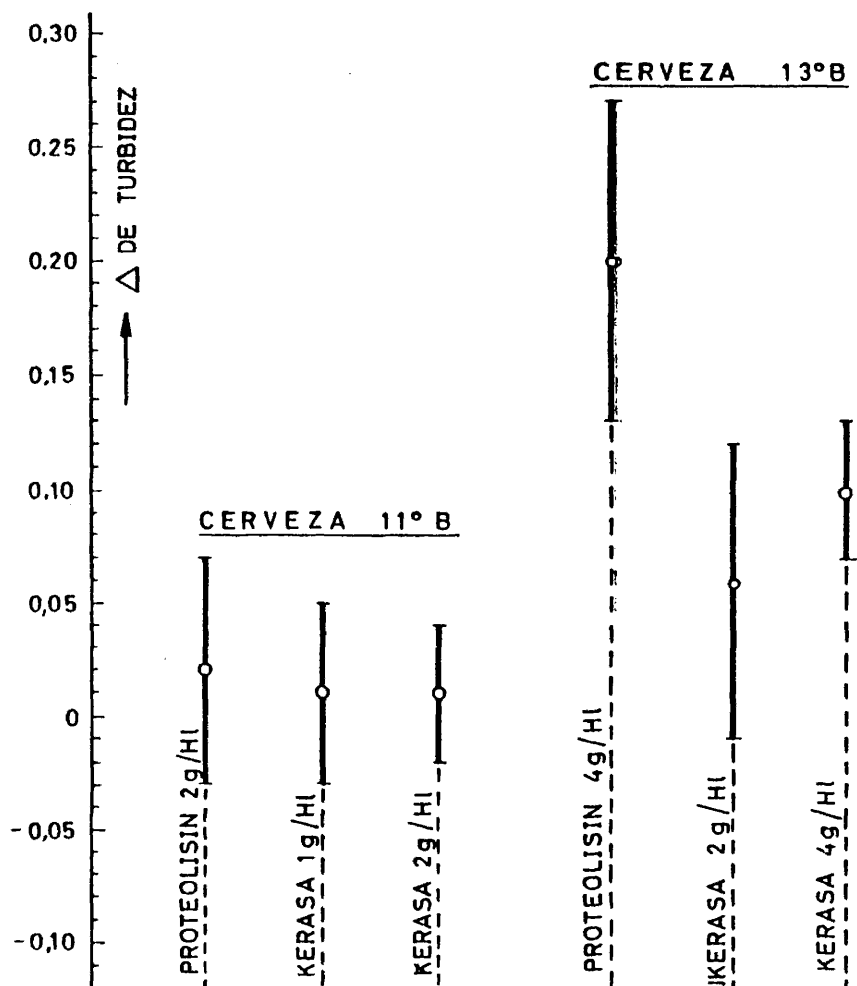
Vm = Valor medio de (Δ) en cada tratamiento, con independencia de la fecha de muestreo, obtenido por suma algebraica de los 8 valores medios (2 barriles por 4 muestreos de fecha), obtenidos por resta de la turbidez media de 7 botellas en cada caso, leídas a 0-5°C. y temperatura ambiente.

M = Margen de confianza de la media por P = 95% y 7 libertades.

GRAFICA 22

INCREMENTO DE TURBIDEZ EN CERVEZA
POR CHOQUE TERMICO ENTRE 20°C Y 0°-5°C
100 DIAS DE ESTANTE.

REPRESENTACION DE LA TABLA 45



- 316 -

En la cerveza de 13º B, dicho incremento es aprecia -
ble y el tratamiento con "KERASA" es significativamente más eficaz -
que el tratamiento con preparado de papaína, pero sin apreciarse sig-
nificación entre las dos dosis de "KERASA" estudiadas.

7. CONCLUSIONES

1.- La cepa original de Streptomyces fradiae empleada, ha producido proteasas con buenos rendimientos en las condiciones y medios ensayados.

2.- Las fermentaciones con una temperatura de incubación de 40º C. han sido las mejores de las ensayadas en cuanto a crecimiento y producción de proteasas.

3.- Se han obtenido los mejores resultados en fermentaciones con caudal de aire de 1 litro, por litro de medio por minuto.

4.- Las adiciones de varios nutrientes, a los medios de cultivo ensayados, a diferentes horas y concentraciones durante las fermentaciones en las condiciones ensayadas, no dieron ningún resultado positivo.

5.- El medio ensayado 2, en el que se sustituyó el polvo de pezuña por harina de soja, levadura de cerveza y corn-steep, como materiales proteicos y se reforzó con almidón, resultó ser el

mejor para las fermentaciones y producción de proteasa, con la cepa original.

6.- De la cepa original de Streptomyces fradiae , -
nuestro, se aislaron posteriormente colonias blancas y rosas. Los
resultados de las fermentaciones de los caldos procedentes de inóculos
de una u otra colonia, han sido desiguales.

7.- El medio ensayado E-4, en el que respecto al me--
dio 2, se rebajó la concentración de harina de soja y corn-steep, se -
prescindió de la levadura de cerveza y se añadió al medio carbonato
cálcico, ha resultado ser el mejor para la obtención de los caldos más
activos en actividad proteolítica, utilizando como inóculo la colonia -
blanca del Streptomyces fradiae.

8.- Las proteasas con mayor actividad proteolítica,
tanto en unidades Queratinolíticas como Hemoglobinolíticas, procedían
de:

a) Caldos de fermentación cosechados con un
pH final de 7,5 á 8,4.

b) Fermentaciones con la colonia blanca.

c) Caldos de fermentación cosechados con más de 12.000 U. Hemoglobínicas/ml.

9.- Las posteriores fermentaciones obtenidas en la Planta Industrial, siguiendo el proceso desarrollado por nosotros para la Planta Semipiloto y la Planta Piloto, han confirmado los resultados - previos establecidos en nuestro trabajo.

10.- Las proteasas obtenidas por fermentación y siguiendo el proceso anteriormente citado, han sido muy eficaces empleadas como depilantes de pieles de cordero.

11.- Estas mismas proteasas han demostrado también su utilidad empleándolas como potenciadoras de la acción antibiótica del Clorhidrato de Tetraciclina. Entran en la composición de las especialidades "TETRALEN" y "CLOR-MITEN".

12.- Se ha preparado un producto comercial, "FRADIA-SA", que se emplea como aditivo de los piensos, en la alimentación de animales, a partir de las proteasas obtenidas.

13.- Asimismo y como otro producto comercial preparado por la Cía. , "KERASA", se han probado y se emplean en la industria cervecera, como solubilizadores de las proteínas residua--

- 320 -

les de las cervezas y como producto clarificante y estabilizar cobidal.

8. BIBLIOGRAFIA

ANSON, M.L., J. Gen. Physiol, 22, 79 (1938) (45).

ANSON, M.L. and MIRSKY, A.E. (1932), J. Gen. Physiol, 16, 59 (46)

ANSON, M.L. and MIRSKY, A.E. (1933), J. Gen. Physiol, 17 151 (47)

ANSON, M.L. (1937), a, J.Gen. Physiol, 20, 561 (48)

ANSON. M.L., (1937), b, J. Gen. Physiol, 20, 565 (49)

BERGEY 'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY , Sixth Edition

Robert S. Breed. E.G.D. Murray.

A. PARKER MITCHENS.

Baltimore Ed. The Wilkins Company (1948) (42).

BERTEL, Rudolf (1939). Brevet francais n° 513.455 (31)

BEUK, J.F. et. al (1959). Method of tendering meat. U.S. Patent office

2.903.362 (Sept. 8) (21).

BOIDIN, C. "Definición, producción y utilización de enzimas". *Ref. Tech. Ind. Cuir* (1971), 63 (9) 280-90 (fr.) (7).

BOIDIN y EFFRONT (1932) - Brevet français nº 727.004 (30).

BRYEE, W.W. "Uso y enzimas en manufacturas de alimentos". *Food. Manuf.* 41 (1), 18-20 (1966) (Eng.) (8).

CAMBIER, D. et. al. Etude des modifications sériques et urinaires - provoquées chez de jeunes lapins par injections intraveineuses de paine brute. *Bull. Soc. Chin. Biol.* (1969). 51, 891-907 (24).

C.E.P.A. - Método de determinacion de azúcar (51)

C.E.P.A. - Método de determinación de peso seco de Micelio (52).

C.E.P.A. Método de valoración de actividad queratinolítica. Método de pezuña. Publicación interna (1962) (44).

CRAPLET, C. La viande de bovins. Livre I (pages 1 a 486) Vigot Frères (1966). Edit. PARIS. (20).

CHAPON, L. Laboratoire de Chimie biologique II. Faculté de Sciences Nancy. Conférence faite au colloque de Brasserie V.E.B.O. á Gand., 24 avril (1970), (40).

CHEFTEL, C. AHERN, M., WANG, D., et TANNENBAUM, S., (1971)

Agr. Food. Chem. 19, 155. (28).

CHEFTEL, C. Laboratorio de Bioquímica alimentaria de la Universidad
de Técnicas de Languedoc. (1972) (27).

DE CLERCK, J. "Enzimas y estabilización de cervezas". Ann Technol.

Agr. (1972), 21 (3) 335-41 (fr.) (34).

DUMONT, B.L. "Reflexions sur la qualité et la qualification des vian -
des. L'alimentation et la vie", 48, 1-2-3, 51-56 (1966). (19).

FITZGERALD, R.J., et al., Arch. Oral. Biol., (1968), 13, 125 - 128
(17).

FOLIN, O., and CEOCACALTEAU, V., (1927), J.B. L. Chem., 73, 627
(50).

GAVERN, T. Walker, publ. en "Drug and Cosmetic Industry". Mayo
(1963), Vol. 92, nº 5, pág. 563-564.

GUIDE TO THE CLASSIFICATION AND IDENTIFICATION OF THE ACTINO-
MYCETES and their Antibiotics. (58).

HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS (East 1965-66) (Método Es-
tadístico) (53).

HORTH, H. and WAGUES, H. "Dentífricos que contienen enzimas". Ger. Offen., (1938) 189 (Cl. A. 611) 25 Feb. (1971). App. 28 Jul. (1969). 11pp. (16).

HUFFMAN, D.L. et. al. The effect of ante-mortem "injection of papain on tenderness of chickens Poultry Sci. (1967) 40, 1627-1630 (23).

KEAY, S.L. Process Biochemistry, August, (1971), 17-21 (9).

LELAND, A. Underkotler y ROBERT L. Chales. Miles Chem. Co. (Tarkenton Plant), Div. of Miles Laboratories, Inc. Clifton, N.J. (1).

MC. INTOSH, E.N. et al "The effect of papain preparations of beef skeletal muscle proteins".

J. Food Sci. (1963), nº 28, 283-285 (22).

MACEY, A. (1979), Brau-Rundsch, 90 (1-2), 13-15 (35).

METHODS IN ENZIMOLOGY. Vol. 1 Ed. Academic Press Inc., - Publishers New York, (1955), pág. 140-145 (55).

MOLL, M. et al "Quelques méthodes de contrôle des enzymes protéolytiques" Centre de Recherche et Développement TEPRAL. 3.3-11(57).

MORIYAMA, K. et al. Biochem. Biophys. Acta (1967) 139, 382 (3).

MORIHARA K., OKA, T., and TZUSUKI, H., *Biochim. Biophys. Acta* 139 (1967), 382-397 (13).

NESTOROV, N. et al. Influence of Plant proteases upon the structure and enzymatic activity of skeletal muscles. 17th. European Meeting of meat Research Workers (1971). BRISTOL (26).

NESTOROV, N. et. al. Effect of some plant proteases injected in vivo in the enzymatic activity of liver tissue. 16th. European Meeting of Meat Research Workers. (1970). VARNA. (25).

NICKERSON, W.J. y NOVAL, Princeton, University Heighiu, N.J. - Process of treating Keratinaceous material and a Keratinase produced Thereby (10).

NICKERSON, W.J., NOVAL, J.J. and ROBINSON, R.S. *Biochim., - biophys. Acta.* 77 (1963), 73-86 (11).

NICKERSON, W.J. and DURAND, Susan C. *Biochim. Biophys. Acta* 77 (1963), 87-99, (12).

OKAZAKI, H. "Los enzimas y sus aplicaciones".
Sankyo Kenkyusko Nem. 18, 1-18 (1966) Eng. (6).

PEREZ, J. and SEGURA, R. Published Internally by I.F.E. Madrid.
(1978) (33).

POSADA, J. ALMENAR, J., GALINDO, G., CANDELA, J., SEGURA R.
and PEREZ, J.B. New aspects of beer stabilization and clarification.
Proc. Europ. Brew. Conv. (1979). Berlin (56).

RAIBLE, K. (1979), Brau-Rundsch, 90 (1-2) 26-30. (38).

RUST, J.W. "Efectos de dietas enzimáticas suplementarias cuando se
emplean en la nutrición de terneras".

Univ. Microfilms (Ann Arbor, Mich.) Order nº 63-5 198 151 pp.
Dissertation Abstr. 24.8 (1963) (41).

SCHAFT, H. (1979), Brau-Rundsch, 90 (1-2) 16-23. (36).

SEGURA FERNS, R. Pat. Engl. nº 19.884/74 (1974) (54).

SEGURA FERNS, R., Brit Patent 1512512, May 5 (1975) (39).

SHAVER, K.J., and CHIFT, T. 47th. General Meeting, Int. Assoc.
Dental Res., Houston, Texas, March (1969) (18).

SHERWOOD, M. "Aplicaciones industriales de enzimas".
Sch. Sci. Rev. (1969) 50 (173), 762-76 (Eng.) (5).

SOERENSEN, S.A. Los enzymes Microbiennes et leur utilisations en
brasserie. Indust. alim. agr. (1972) pág. 1267-1276. Danamark. (29).

STOUDT, Thomas J., NOLLSTADT, Karl H. "Enzimas para la higiene oral". Demanch 2, 150-754 (Cl. A. 61K., C. 07 g., C. 12 d) 11 May. (1973) U.S. Appl. 170, 642, 10 Aug. 1971 20pp. (15).

TAKAMINE, J. Journal of Industrial and Engeneering Chemistry (1914) 6 (10), 824-824. (32).

TSYPEROVICH, A.S. "Uso presente y futuro de enzimas".

Fermentg. Med. Pisheli, Prom. Sel Khoz (1968) 133-42 (4).

U.S.P. XVIII (59).

U.S.P. XIX. (60).

VAN DROHME, M. (1979) Brau-Rundsch, 90 (1-2), 23-25 (37).

WAKSMAN, Selman A. and LECHEVALIER, Hubert A.

Ed. the Williams and Wilkins Company.

Baltimore (1953). (43).

YOSHIDA, F., et. al. Agr. Biol. Chem. (1962), 26, 547, 554; (1963) 27, 302, 310 (2).

